VOLUMEN 7 ABRIL-JUNIO 1954 NUM. 2

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
28 MAR 1955

SUMARIO

Página

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Contribución al estudio de las propiedades bioquímicas y sensibilidad a los antibióticos del Diplo-estreptococcus suis, por **Santos Ovejero, Miguel Díez y R. Pascual** 85

Extracción y observación al microscopio electrónico de las inclusiones intracelulares cristalinas producidas por el virus «Mosaico del tabaco», por **Miguel Rubio Huertos.** 97

Una nueva especie de Endomycopsis: E. balearica nov. sp. aislada de concentrado de tanino de encina, por **Arnaldo Socias Amorós, Carlos Ramírez Gómez y Rafael Genestar Serra** 107

Una nueva especie de Debaryomices: el Debaryomices Toletanus nov. sp., por **Arnaldo Socias Amorós, Carlos Ramírez Gómez y Fernando Peláez Campomanes** 111

Sobre la higienización de la leche por radiofrecuencia, por **Vicente M. Piqueras** 115

Luodiagnóstico por la reacción de fijación del complemento con suspensión de treponemas de Reiter, por **F. Moreno de Vega** 125

Nueva aportación al estudio de la determinación biológica de los efectos desnaturalizantes de la acción proteásica sobre los sueros antitóxicos, por **F. Moreno de Vega** 135

Presencia de especies de Trichosporon en orujos de oliva, por **O. Verona** 175

INFORMACION

Renovación de Directiva 181

Nuevo Socio de Honor 181

Actas de la Sociedad 182

SE SUPLICA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 152 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.

VOLUMEN 7 ABRIL-JUNIO 1954 NUM. 2

Microbiología Española

publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. don Arnaldo Socías Amorós, Director del Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, del C. S. I. C.

Prof. Dr. don Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. don Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Gráficas TEJARIO, S. A. Pza. del Biombo, 4-Tel. 22 12 88-Madrid

FACULTAD DE VETERINARIA DE LEON
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOQUIMICAS Y SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS DEL «DIPLO-ESTREPTOCOCCUS SUIS» (*)

por

Santos Ovejero, Miguel Díez y R. Pascual.

MORFOLOGIA

La presentación más frecuente de este germen, tanto en frotis de órganos como en los medios de cultivo, es en forma de cocos ligeramente alargados y agrupados en cadenas cortas, constituídas por parejas de cocos (diplo-estreptococos).

En los medios de cultivo se modifica esta morfología típica, especialmente en los medios sólidos, observándose con frecuenccia parejas de cocos sueltos o agrupaciones de estos diplococos en cadenas de cuatro a seis elementos.

No poseen cápsulas ni in vivo ni in vitro.

COLORACION

Toma bien los colores de anilina usados en Bacteriología y queda coloreado por el método de Gram (positivo).

CULTIVO

1) **Medios comunes.**—Es aerobio y anaerobio facultativo. A 37° C. crece en los medios corrientes de laboratorio.

(*) Trabajo presentado al VI Congreso Internacional de Microbiología. Roma, septiembre de 1953.

En caldo común, y en caldo con peptona Martin, crece en veinticuatro horas, produciendo un enturbiamiento uniforme. A las cuarenta y ochosetenta y dos horas se produce un pequeño sedimento, que se separa por agitación del tubo, no apareciendo los flóculos típicos de los demás estreptococos, en los que la aglomeración del cultivo en el fondo del tubo permite, y es generalmente un carácter típico el aclaramiento del medio.

En caldo suero el crecimiento es más abundante, y el aclaramiento del medio no se observa más que después de varios días de estufa, y nunca totalmente.

En agua de peptona (en nuestros ensayos hemos utilizado Peptona Difco, de «Difco Laboratories», Michigan, U. S. A.) crece con facilidad, lográndose en veinticuatro horas a 37° C un enturbamiento análogo, y a veces superior al obtenido en medios de enriquecimiento. Este carácter no ha sido observado por algunos autores, que han logrado en este medio crecimientos deficientes, posiblemente por la calidad de las peptonas utilizadas en la preparación del medio.

En agar común crece pobremente, formando colonias muy pequeñas y grises sobre la superficie del agar.

En agar-suero, a las veinticuatro-cuarenta y ocho horas de estufa a 37° C., aparecen pequeñas colonias ligeramente elevadas, lisas y de bordes regulares.

En gelatina, por picadura, produce un crecimiento débil, con colonias blanquecinas.

2) **Medios especiales.**—Por cultivo en medio Kovacs (agar al 3 %, 80 c. c.; sangre de carnero desfibrinada, 20 c. c. y glucosa, 2 gramos), el Streptococcus suis presenta estría blanca grisácea, cambiando el color del medio en marrón café con leche.

El medio de Belensky-Popowa (agar al 3 %, 100 c. c.; sangre de conejo desfibrinada, 10 c. c.; bilis de buey, 10 c. c.), presenta estría de color marrón característica.

En medio Harrison-Van der Leck (peptona, 20 grs.; esculina, 0'5 grs.; citrato de hierro, 0'5 grs.; agar, 30 grs.; agua destilada, 1.000 cc.) el germen por desdoblamiento de la esculina cambia el color del medio en tono negruzco.

En caldo bilis de buey al 20 %, y en agar bilis de buey al 10 %, crece normalmente.

Se desarrolla con normalidad en agar con pH 9'6, y en agar con un 6'5 de cloruro de sodio.

PROPIEDADES DE SU METABOLISMO

1) **Actividades reductoras.**—En leche tornasolada, acidifica a las veinticuatro horas, coagula a las cuarenta y ocho-setenta y dos horas, y reduce a las veinticuatro-cuarenta y ocho horas.

En leche azul de metileno, reduce completa o incompletamente el azul de metileno de las veinticuatro a las noventa y seis horas.

El caldo con rojo neutro, reduce el medio.

El agar-suero con telurito potásico al 1 : 100 crece con formación de pequeñas colonias de color negro brillante.

2) **Actividades proteolíticas.**—En agua de peptona no se produce indol.

En suero coagulado crece sin provocar la licuación del medio.

Después de tres días a temperatura eugenésica, no se observa licuación de la gelatina.

Sobre la leche no ejerce acción proteolítica.

3) **Acción sobre carbohidratos y polialcoholes.**—Fermenta con producción de ácido, pero no de gas, la glucosa, levulosa, galactosa, maltosa, lactosa, salicina, sacarosa y esculina. No se produce ácido con la dulcita, dextrina y xilosa. Tienen acción variable sobre la manita, arabinosa, rafinosa e inulina.

Hidroliza ligeramente el hipurato sódico.

4) **Actividades enzimáticas.**—A las veinticuatro horas de cultivo a 37° C. el Streptococcus suis produce catalasa.

La producción de coagulasa y fibrinolisina es negativa.

5) **Actividades hemolíticas.**—Efectuadas siembras en agar-sangre (de conejo) al 5 : 100, se observa la aparición de una zona de hemolisis alfa a las veinticuatro-cuarenta y ocho horas, mostrándose este carácter con bastante regularidad, a pesar de que en alguna cepa de las estudiadas por nosotros se presenta en forma atípica el halo verdoso.

6) **Producción de SH_2.**—El germen produce en su metabolismo hidrógeno sulfurado claramente demostrable.

7) **Reducción de nitratos.**—El Streptococcus suis reduce los nitratos a nitritos.

8) **Reacción de Voges-Proskauer.**—La reacción es negativa.

VITALIDAD Y RESISTENCIA

En medios líquidos aerobios y a la temperatura de laboratorio permanece vivo de tres a cuatro meses, según hemos podido comprobar al practicar las resiembras. En medios con carbohidratos, en los que se producen ácidos por la desintegración de estos compuestos, la vitalidad se compromete y gran número de gérmenes pierden su propiedad de reproducción, alterándose en su morfología y coloración, en cultivos de uno a dos meses.

Resiste a 60° C. de veinticinco-treinta y cinco minutos.

pH final en caldo glucosado al 1 %, 3'94-4'4.

TOXINAS. ACCION PATOGENA

Los filtrados de cultivos de cuatro a seis días no son tóxicos para los animales de experimentación (ratón, cobaya, conejo).

En general, el Streptococcus suis es poco patógeno para los animales de laboratorio. Cultivos en caldo o agua de peptona, de veinticuatro a cuarenta y ocho horas, han sido inoculados al ratón con los resultados siguientes:

a) No es patógeno por las vías hipodérmica o intraperitoneal.

b) Provoca una septicemia mortal por vía intravenosa, aunque por resiembras en medios de cultivo parece perder el poder infectante.

LUGAR DEL STREPTOCOCCUS SUIS EN LA SISTEMATICA BACTERIANA

Willems (Bélgica), después de realizar un estudio de este agente infeccioso, concluía que era una especie no bien definida (1933). Este criterio sobre el agente infeccioso que nos ocupa ha sido el predominante y, sin

duda, dicha posición ha sido y es justificada por el escaso número de cepas estudiadas, y, también, por haberse ocupado solamente del estudio de algunos caracteres, insuficientes para conocer este germen, que, para Ubertini (1931), se aproxima a los Streptococcus saprofitos de la leche y, para Blanco (1940), puede incluírsele en el complejo grupo de los enterococos.

Sin que queramos sentar una norma taxonómica inconmovible, siempre difícil en la Ciencia de las Bacterias, trataremos de revisar cómo se ha definido hasta el momento actual la especie Streptococcus faecalis o Enterococo.

La observación del cuadro número 1 pone de manifiesto la discrepancia existente entre los autores más acreditados al definir la citada especie bacteriana.

Las diferencias señaladas por diversos autores en el Streptococcus faecalis, permiten, no obstante, mantener la unidad de especie establecida sobre un grupo de caracteres comunes que se ofrecen con regularidad.

La descripción aceptada por la Sociedad de Bacteriólogos Americanos (Bergey, 1948), pos permite comprobar la identidad del Diplo-Streptococcus suis y el Streptococcus faecalis o Enterococo.

Nuestro trabajo experimental, realizado con cepas aisladas de infecciones del cerdo, no se ha limitado a la comprobación de los caracteres descritos en el Manual de Clasificación de Bergey, sino que, según se comprueba en el cuadro 3-4, hemos estudiado cuidadosamente diversos caracteres del metabolismo bacteriano de estos gérmenes, llegando a establecer su identidad sobre una amplia base experimental.

En la actualidad, nos encontramos en la preparación de los elementos necesarios para realizar el estudio antigénico de nuestras cepas de Streptococcus Suis.

SENSIBILIDAD DEL STREPTOCOCCUS SUIS A LOS ANTIBIOTICOS

Realizamos los ensayos frente a diversos antibióticos, utilizando la prueba de discos con diferentes concentraciones, preparados por «Difco

CUADRO 1

DEFINICIÓN DE ALGUNOS DE LOS CARACTERES DEL *Streptococcus faecalis*, SEGÚN TOPLEY Y BERGEY.

	Hidrólisis del hipurato sódico.	Crecimiento en agar, pH 9,6	Crecimiento en agar con 6,5 ClNa	Crecimiento en el agar telurito potásico al 1/15.000
Según Topley	Generalmente es negativo.	Falta en la mayoría de razas.	Falta en la mayoría de razas.	Negativo.
Según Bergey	Puede ser positivo.	Hay crecimiento.	Hay crecimiento.	Hay crecimiento.
Según nuestros estudios	Hidrólisis ligera.	Hay crecimiento.	Hay crecimiento.	Hay crecimiento.

CUADRO 2

IDENTIDAD DE CARACTERES MORFOLÓGICOS, COLORACIÓN, CULTIVO, RESISTENCIA Y PODER PATÓGENO ENTRE EL *Streptococcus Suis* Y EL *Streptococcus faecalis.*

Caracteres	*Streptococcus Suis*	*Streptococcus faecalis*
Morfología	Diplo-estreptococo	Diplo-estreptococo.
Coloración	Gram positivo	Gram positivo.
Cultivo:		
Agar común	Crecimiento pobre	Crecimiento pobre.
Agar suero	Colonias pequeñas, redondas y lisas	Colonias pequeñas, redondas y lisas.
Caldo común	Enturbia con sedimento	Enturbia con sedimento.
Caldo suero	Crecimiento más abundante	Crecimiento más abundante.
Agua de peptona	Crece bien	Crece bien.
Medio Kovacs	Estría blanco-grisácea, cambiando el medio en color café con leche	Estría blanco-grisácea, cambiando el medio en color café con leche.
Medio Belensky	Estría de color marrón	Estría color marrón.
Medio Harrson	Ennegrece el medio	Ennegece el medio.
Caldo bilis buey	Crece bien	Crece bien.
Agar bilis buey	Crece	Crece.
Agar pH 9,6	Crece	Crece.
Agar 6,5 por 100 ClNa	Crece	Crece.
Resistencia	A 60 grados C. resiste veinticinco-treinta y cinco minutos	A 60 grados C. resiste veinticinco-treinta y cinco minutos.
Patogenicidad para el ratón	Por vía intravenosa, recién aislado, mata, y en cultivos pierde poder infectante	Escasa acción patógena.

CUADRO 3

IDENTIDAD DE CARACTERES METABÓLICOS ENTRE EL *Streptococcus Suis* Y EL *Streptococcus faecalis.*

Caracteres	*Streptococcus suis*	*Streptococcus faecalis.*
Actividades reductoras:		
Leche tornasolada	Acidifica, coagula, reduce	Acidifica, coagula, reduce.
Leche azul de metileno	Reduce completa o incompletamente	Reduce.
Rojo neutro	Reduce	Reduce.
Agar teluritompotásico 1: 100	Forma colonias color negro brillante	Forma colonias color negro brillante.
Actividades proteolíticas:		
Agua de peptona	No forma indol	No forma indol.
Suero coagulado	No licúa	No licúa.
Gelatina	No licúa	No licúa.
Leche	Sin acción proteolítica	Sin acción proteolítica.
Acción sobre carbohidratos y polialcoholes:		
Glucosa	Acidifica (pH final 3,94-4,4)	Acidifica (pH final 4-4,4).
Levulosa	Acidifica	Acidifica.
Galactosa	Acidifica	Acidifica.
Maltosa	Acidifica	Acidifica.
Lactosa	Acidifica	Acidifica.
Salicina	Acidifica	Acidifica.
Sacarosa	Acidifica	Acidifica.
Dulcita	No acidifica	Acidifica.
Dextrina	No acidifica	Acidifica.
Xilosa	No acidifica	Acidifica muy rarísima vez.
Manita	Acción variable	Acidifica.
Arabinosa, rafinosa, inulina	Acción variable	Acción variable.
Actividades ezimáticas:		
Catalasa	Positiva	Positiva.
Coagulasa y fibrinolisina	Negativa	Negativa.
Actividades hemolíticas	Tipo Alfa o Alfa atípica	Hemólisis verdosa.
Formación de hidrógeno sulfurado	Positivo	Positivo.
Reacción de Voges	Negativo	Negativo.

CUADRO 4

DIÁMETRO EN MM. DE LAS ZONAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CON DISCOS DE 6,5 MM./D. PARA EL *Streptococcus suis*.

Germen	Cloromicetina			Estreptomicina			Penicilina			Polymixina.
	10 mcg.	30 mcg.	60 mcg.	1 mcg.	10 mcg.	100 mcg.	0,5 U. I.	10 U. I.	30 U. I.	30 mcg.
Strep. suis. 1	16	20	23	—	—	16	—	—	22	—
Strep. suis. 2	17,5	22	24	—	—	20	—	—	23	—
Strep. suis. 3	21	27	28	—	—	14	—	—	25	—
Strep. suis. 4	25	25	28	—	—	18	—	—	23	—
Strep. suis. 5	19	21	23	—	—	12	—	—	21	—
Strep. suis. 6	17	19	22	—	—	12	—	—	24	—
Strep. suis. 7	22	25	27	—	—	15	—	—	23	—

CUADRO 5

DIÁMETRO EN MM. DE LAS ZONAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CON DISCOS DE 6,5 MM./D. PARA EL *Streptococcus suis*.

Germen	Auromicetina			Terramicina			Bacitracina		
	10 mcg.	30 mcg.	60 mcg.	10 mcg.	30 mcg.	60 mcg.	2 U. I.	10 U. I.	20 U. I.
Strep. suis. 1	24	25	27	22	26	31	18	22	24
Strep. suis. 2	20	24	25	20	23	24	13	22	26
Strep. suis. 3	21	27	28	21	25	27	17	26	28
Strep. suis. 4	27	30	31	21	27	30	12	26	28
Strep. suis. 5	22	23	27	20	23	26	19	21	27
Strep. suis. 6	20	21	26	21	21	25	20	23	25
Strep. suis. 7	20	21	26	21	23	29	17	21	22

Laboratories», Michigan, U. S. A., hemos observado los resultados que se indican en los cuadros números 4 y 5.

CONCLUSIONES

1.ª Se estudian ampliamente los caracteres de cultivo, el metabolismo y la acción patógena del Diplo-Streptococcus suis.

2.ª Se establece la identidad de esta especie microbiana con el Streptococcus faecalis o Enterococo.

3.ª Mediante la prueba de los discos, se comprueba la acción inhibitoria de la Aureomicina, Terramicina, Cloromicetina y Bacitracina, sobre la especie bacteriana patógena para cerdo y designada como Diplo-streptococcus suis.

BIBLIOGRAFIA

TOPLEY, WILSON, MILES.—Bacteriología e Inmunidad. 2.ª edición.

C. M. BARZIZZA., A. MANSO, SOTO.—Microbiología. 3.ª edición.

BERGEY.—1948. Manual of determinative Bacteriology.

OVEJERO S. FRANCO, G. ALVAREZ.—1944.Las enfermedades infect.-contagiosas del cerdo.

G. CURASSON.—Maladies infectieuses des animaux domestiques.

LESBOUYRIES et BERTHELON.—1935. Rec. de Med. Vet. 921.

J. R. RAY.—Archivos de Veterinaria Práctica. Tomo I.

BAOUTET P.—1943. Rec. Med. Vet. 61.

SERAS, A.—1941. La estreptococia del cerdo (monografía).

BUGALLO.—1939. Bol. Col. Nac. Vet. España. 321

BLANCO.—1940. Trabajos del I. B. A. 117.

BULIARD.—1934. Jour. Ame. Vet. Med. Asso.

UBERTINI.—1931. La clínica Vet.

WILLEMS.—1923. An. de Med. Vet. 105.

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL,
SECCION DE MICROBIOLOGIA, DE MADRID

EXTRACCION Y OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE LAS INCLUSIONES INTRACELULARES CRISTALINAS PRODUCIDAS POR EL VIRUS «MOSAICO DEL TABACO» (*)

por

Miguel Rubio Huertos.

Una de las principales características de muchas enfermedades producidas por virus, ya se trate de virus animales, virus de insectos o de los que atacan a las plantas, es la formación de inclusiones típicas en las células huéspedes, y se han realizado numerosos estudios sobre su morfología, distribución, etc,. estableciéndose diversas teorías sobre su composición, cuestión ésta aclarada recientemente gracias a su observación directa en el microscopio electrónico, por medio de diversas técnicas, según la naturaleza de tales inclusiones. El tema de este trabajo es la descripción de una nueva técnica para la extracción intacta de las inclusiones cristalinas producidas por el virus «mosaico del tabaco» y su examen al microscopio electrónico.

Las inclusiones intracelulares producidas por diferentes virus de plantas, difieren en su estabilidad, solubilidad en agua y resistencia al ser manejada con agujas, micromanipuladores, etc.

En 1950, Rubio Huertos extrajo las inclusiones intracelulares formadas por los virus «anillo negro de la col», «mosaico de la coliflor», «grabado intenso del tabaco» (Severe etch), «mosaico del Hyoscya-

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid, por la Sociedad de Microbiólogos Españoles, el día 19 de octubre de 1953.

m u s» y «mosaico aucuba del tomate». Todas estas inclusiones resisten a las manipulaciones necesarias para su extracción y son insolubles o ligeramente solubles en agua, por lo que fueron extraídas sin previo tratamiento fijador y pudieron ser examinadas en el microscopio electrónico (1). Por otro lado, las inclusiones cristalinas producidas por el «mosaico del tabaco», en forma de placas exagonales, prismas y agujas, son muy solubles en agua y, como demostró Sheffiel (3), son inmediatamente destruídas al ser tocadas con las agujas de disección, que hay que emplear para efectuar la extracción. En 1953, Steere y Williams (4), en los Estados Unidos, idearon un método de desecación a muy bajas temperaturas —165° C.— y alto vacío, que hizo posible la extracción intacta de las células de dichas inclusiones cristalinas producidas por el «mosaico del tabaco», pudiendo así observarlas al microscopio electrónico, viendo que estaban compuestas completamente por partículas de virus y una substancia volátil. Este método de extracción es bastante engorroso, por el necesario empleo de nitrógeno o isopentano líquidos para conseguir las bajas temperaturas y la utilización de aparatos especiales de álto vacío, no fáciles de encontrar en España, y pensando que el efecto del desecado a bajas temperaturas no es, probablemente, otro que el de fijar las nucleoproteínas de que se componen los cristales, haciéndolas ménos solubles en agua y más resistentes a su manejo, hemos pensado una nueva técnica sencillísima, y para la cual no hace falta nigún aparato o substancias especiales, y consiste en lo siguiente:

Se arrancan tiras de epidermis de las hojas de tabaco infectadas conteniendo las inclusiones cristalinas en sus células (fig. 1) y se sumergen durante tres-cuatro minutos en el fijador de Carnoy (alcohol absoluto, éter y ácido acético). Se pasan durante un par de minutos a alcohol de 96° C. y se colocan en agua destilada. Los cristales intactos entonces pueden ser fácilmente extraídos de las células (fig. 2) por medio de un par de agujas finas, según la técnica corriente (Rubio, 1950), tomados con una micropipeta y colocados en la rejilla porta del microscopio electrónico para su examen.

Las tiras de epidermis con las inclusiones, si se desea, pueden ser conservadas en alcohol de 96°, después de su tratamiento con el fijador de Carnoy, por más de un año.

Los resultados pueden verse en las microfotografías adjuntas.

Damos las gracias al Prof. Dr. E. Van Slogteren, Director del «Instituut voor Bloembollenonderzoek», de Lisse (Holanda), donde fué llevado a cabo este trabajo, y al Sr. Bakker, por tomar las fotografías de nuestras preparaciones.

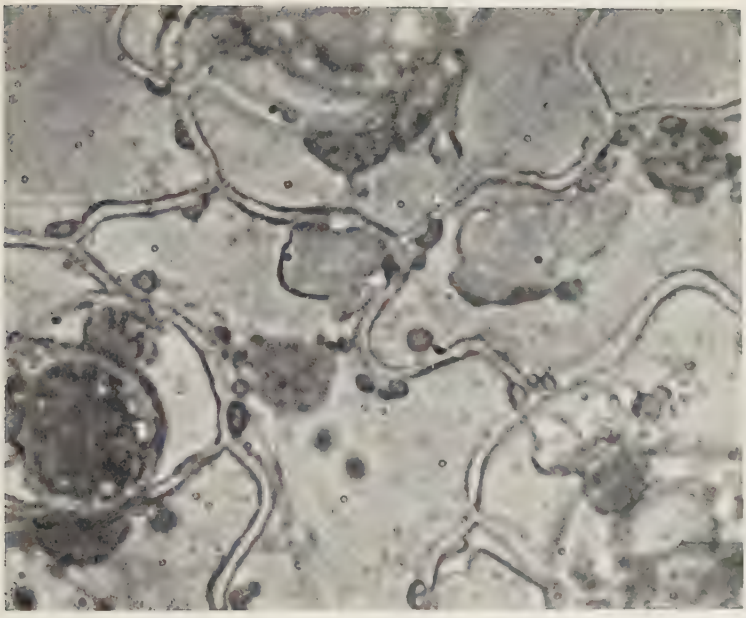
BIBLIOGRAFIA

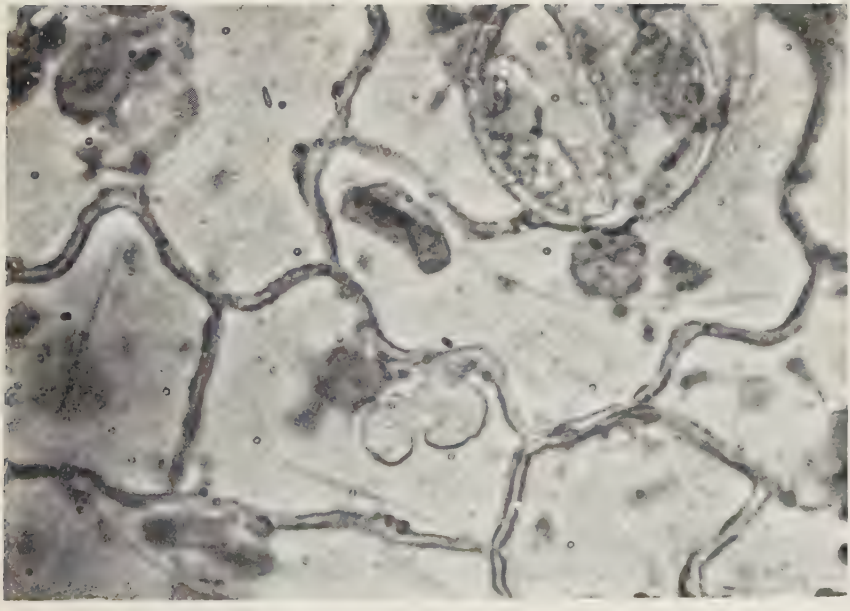
(1) **RUBIO HUERTOS, M.**—1950. Estudios sobre inclusiones intacelulares producidas en las plantas. **Microbiología Española.** 3. 207-232.

(2) **RUBIO HUERTOS, M.,** and **VAN SLOGTEREN, R.**—1954. Electron and light microscopy studies of inclusión bodies produced by Broad bean Mottle virus (en prensa).

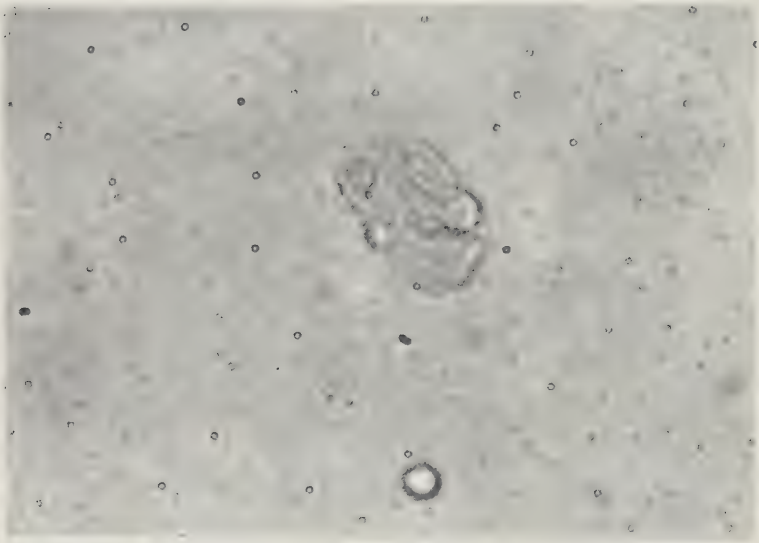
(3) **SHEFFILD, E. M.**—1946. Preliminary studies in the electron microscope of some plant virus inlusion bodies. **Royal Micros. Soc.** 61. 30-45.

(4) **STEERE, R. L.** and **WILLIAMS.**—1953. Identification of crystalline inclusions bodies extracted intact from plant cells infected with tobacco mosaic virus. **Amer. Jour. Bot.** 40. 81.





Figs. 1 y 2.—Epidermis de hoja de tabaco infectado con Mosaico de Tabaco, mostrando las inclusiones cristalinas (placas y agujas).



Figs. 3 y 4.—Placas cristalinas extraídas de la célula.

Fig. 5.—Cristal extraído de la célula y visto al microscopio electrónico. Se puede ver que está formado por partículas de virus formando capas. Sombreado con paladio × 20000.

Fig. 6.—Cristal muy fino extraído por la célula y empezando a disolverse, en el que se ve que está formado por partículas de virus. Sombreado con paladio × 24000.

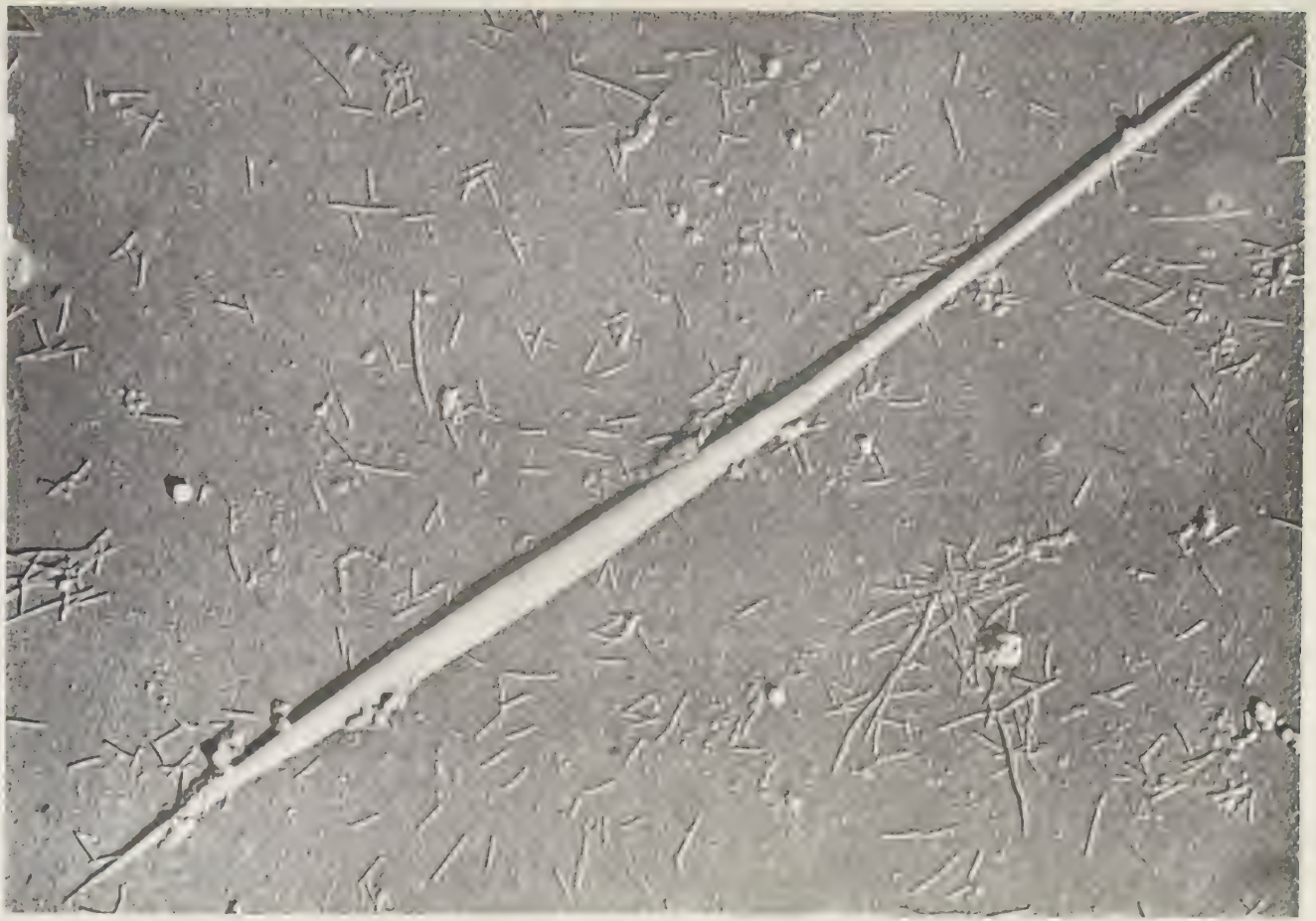


Fig. 7.—Aguja paracristalina formada por partículas de virus. Sombreado con paladio. × 15000.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

UNA NUEVA ESPECIE DE «ENDOMYCOPSIS: ENDOMYCOPSIS BALEARICA NOV. SP.» AISLADA DE CONCENTRADO DE TANINO DE ENCINA (*)

por

Arnaldo Socias Amorós, Carlos Ramírez Gómez

y Rafael Genestar Serra

Este organismo fué aislado de un concentrado de taninos, extraído de corteza de encina, de la isla de Mallorca. Sus características morfológicas permiten incluirle en el género Endomycopsis Dekker. Estas son las siguientes:

Desarrollo intenso de micelio verdadero con blastosporas, además de seudomicelio y células de levadura; ascosporas en forma de sombrero.

Pero sus características fisiológicas, distintas de las especies descritas hasta ahora, nos permite incluir este organismo en una nueva especie, para la que proponemos el nombre de Endomycopsis balearica.

Descripción.

En extracto de malta, a los tres días a 25° C, las células son redondas a ovales (3,5-6) . (5-8,5) micras. Sólo se forma depósito en el fondo del matraz (fig. 1 A).

Después de un mes a 17° C, sólo se observa depósito.

En agar-malta, a los tres días a 25° C, las células son ovales (3,5-7) . (6-9) micras, observándose micelio verdadero.

La estría sobre agar-malta, después de un mes a 17° C, es de color blanco crema, rugosa, con franja de micelio verdadero en los bordes.

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles, el día 19 de octubre de 1953.

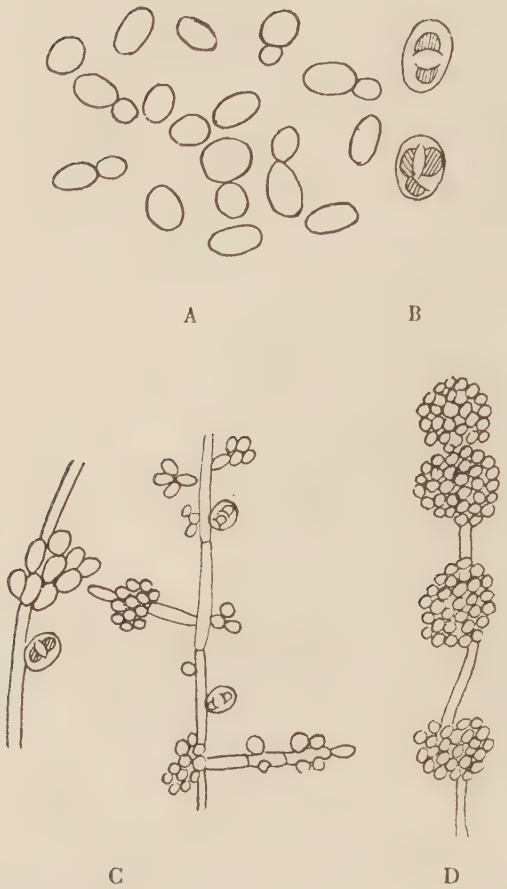


Fig. 1.—Endomycopsis balearica, nov. sp.

A.—*Células de levadura, en malta, a las cuarenta y ocho horas a 25º.*
B.—*Ascas con ascosporas, en medio de Starkey, a los tres días.*
C y D.—*Seudomicelio con ascas.*

Cultivo sobre porta: En agar patata se forma micelio verdadero, ramificado, con blastosporas, que pueden ser redondas a ovales, agrupadas en racimos, observándose también ascas, con esporas en forma de sombrero (fig. 1, C y D).

Esporulación: Las esporas son en forma de sombrero, 1-4 por asca (fi-

gura 1, B). Las ascas están situadas al final de las hifas o intercalarmente. En medio de Starkey se producen a los tres días.

Fermentación:

Glucosa + Maltosa — (a los veintidós días, débil y lenta fermentación)
Galactosa + Lactosa —
Sacarosa — (a los diez días empieza a fermentar lenta y débilmente)

Asimilación de azúcares:

Glucosa + Maltosa +
Galactosa — Lactosa —
Sacarosa +

Asimilación de nitrato potásico: negativa.

Asimilación de alcohol: débilmente positiva.

Hidrólisis de la arbutina: negativa.

Produce abundante éster.

Descripción latina.

In musto maltato cellulae rotundae aut ovoideae (3,5-6) . (5-8,5)μ. Sedimentum formatur.

In agaro maltato cellulae ovoideae (3,5-7) . (6-9)μ.

Cultura in agaro maltato (post unum mensem, 17° C) flavalbida, crispulata, margine piloso.

Mycelium cum blastosporis rotundae aut ovoideae abundat.

Ascosporae in forman petasi; 1-4 in asco.

Fermentatio glucosi, sacchari (lentissima), maltosi (lentissima). In medio minerali cum glucoso, sacharo, maltoso crescit. Nitras kalicus non assimilatur. In medio minerali cum alcohole aethylico parum crescit. Arbutinum non finditur.

CLAVE DE ESPECIES DEL GENERO ENDOMYCOPSIS

1a	Asimilan el nitrato potásico	E. bispora.
b	No asimilan el nitrato potásico	(2)
2a	No fermentan los azúcares	(3)
b	Fermentan la glucosa intensamente...	E. balearica nov. sp.
c	Fermentan débilmente la glucosa	E. selenospora.

d	Fermentan débilmente la glucosa, sacarosa y la maltosa	E. fibuliger. E. fibuliger var. monospora.
e)	Fermentan débilmente la glucosa y la maltosa	E. capsularis.
3a	Asimilan sólo la glucosa; esporas en forma de planeta Saturno	E. javanensis.
b)	Asimilan la glucosa y la galactosa; esporas reniformes	E. selenospora.
c	Asimilación de azúcares desconocida; esporas algo alargadas, con gruesos puntos en las paredes	E. mali.

BIBLIOGRAFIA

J. LODDER y N. J. W. KREGER.—1952. Van Rij; The yeasts. Norrth-Holland Publishing Company. Amsterdam.

Nota.—Esta levadura figura en la colección del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología de Madrid, con el núm. 205.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

UNA NUEVA ESPECIE DE «DEBARYOMYCES»: EL «DEBARYOMYCES TOLETANUS» NOV. SP. (*)

por

Arnaldo Socías Amorós, Carlos Ramírez Gómez
y Fernando Peláez Campomanes.

Este organismo ha sido aislado de una cuba de curtido, conteniendo líquido curtiente a base de extracto de corteza de encina, en Ocaña (Toledo). Sus caracteres morfológicos y fisiológicos permiten su colocación en el género Debaryomyces, pero por sus peculiaridades no puede identificarse con ninguna de las especies descritas hasta ahora, por lo que creemos justificado hacer de este organismo una nueva especie, para la que proponemos el nombre de Debaryomyces toletanus nov. sp.

La especie más próxima a ésta es el D. vini; sin embargo, el D. toletanus tiene las siguientes diferencias: fermenta tardía y débilmente la glucosa, no asimila la galactosa, hidroliza la arbutina; el D. vini no fermenta la glucosa, asimila la galactosa y no hidroliza la arbutina.

Descripción.

En extracto de malta, a los tres días, a 25° C, las células son redondas a corto ovales, de (3-5,5) . (5-8,5) micras. Sólo forma anillo fino y depósito (fig. 1, A).

Al cabo de un mes, a 17° C, se forma depósito y anillo grueso, caedizo.

En agar malta: A los tres días a 25° C, las células forman cadenas ramificadas; son ovales o redondas.

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles, el día 19 de octubre de 1953.

Fig. 1.—Debaryomyces toletanus, nov. sp.

A.—*Células de levadura en malta, a las cuarenta y ocho horas a 25°.*
B.—*Conjugación de células, antes de formación de ascas, en agar malta, a los tres días a 25°.*
C.—*Ascas con ascosporas.*
D.—*Seudomicelio.*

Después de un mes a 17° C, la estría es de color blanco crema, lisa y brillante, con franja transparente de seudomicelio.

Cultivo sobre porta: El seudomicelio está muy bien desarrollado. Blas-

tosporas redondas a ovales. Seudomicelio tipo Mycotorula y Mycotoruloides (fig. 1, D).

Esporulación: Esporula muy bien en malta, previa conjugación (figura 1, B) heterogámica. Una a cuatro esporas por asca. La pared de las esporas es doble (fig. 1, C).

Fermentación:

Glucosa — (después de diez días fermenta débilmente).

Asimilación de azúcares:

Glucosa + Maltosa +
Galactosa — Lactosa —
Sacarosa +

Asimilación de nitrato potásico: negativa.

Asimilación de alcohol: positiva con depósito.

Hidrólisis de la arbutina: positiva.

Descripción latina.

In musto maltato cellulae rotundae aut ovoideae, (3-5,5) . (5-8,5)μ. Sedimentum et anulus subtilis formantur.

In agaro maltato cellulae ovoideae, catenatae, ramosae. Cultura (post unum mensem, 17° C) mollis, glabra, albiflava, nitida.

Pseudomycelium cum blastosporis abundat. Blastosporae rotundae aut ovoideae, verticilatae, typo Mycotorula aut Mycotoruloides.

Ascosporae rotundae aut ovoideae; 1-4 in asco. Copulatio cellularum inaequarum conformationi asci plerumque praecedit.

Fermentatio glucosi (levissima). In medio minerali cum glucoso, saccharo, maltoso crescit. Nitras kalicus non assimilatur. In medio minerali cum alcohole aethylico crescit. Arbutinum finditur.

CLAVE DE ESPECIES DEL GENERO DEBARYOMYCES

1a	Formación temprana de velo mate, ascendente, sobre extracto de malta y fermentación débil		(2)
		D: mrakii.	
b	Velo y fermentación intensa	Bouthilet.	
c	Sin velo o éste es muy tardío		(3)
2a	Asimilan la lactosa	D. hansenii.	

b	No asimilan la lactosa	D. nicotianae.
3a	Asimilan la lactosa	D. subglobosus.
b	No asimilan la lactosa	(4)
4a	Con seudomicelio primitivo o sin él; 1 ó rara vez 2 esporas por asca...	D. kloeckeri.
b	Seudomicelio bien desarrollado; 1-4 esporas por asca	5
5a	Fermentan tardía y débilmente la glucosa, no asimilan la galactosa, hidrolizan la arbutina	D. toletanus nov. sp.
b	No fermentan la glucosa; asimilan la galactosa; no hidrolizan la arbutina	D. vini.

BIBLIOGRAFIA

J. LODDR and N. J. W. KREGER-VAN RIJ.—1952. The Yeasts. North-Holland Publishing Company. Amsterdam.

BOUTHILET.—1951. Mycopath. et Mycol. appl. Vol. VI., fasc. 2; p. 81.

Nota.—Esta levadura figura en la colección del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología, de Madrid, con el número 208.

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA, DE MADRID

SOBRE LA HIGIENIZACION DE LA LECHE POR RADIO-FRECUENCIA (*)

por

Vicente M. Piqueras.

INTRODUCCION

Como consecuencia de unos comentarios con el Profesor Doctor Vilas y el Ingeniero Sr. Jiménez, por la entonces reciente aparición del Decreto de la Presidencia del Gobierno, de fecha 18 de abril de 1952, sobre creación de Centrales lecheras y en el deseo de encontrar nuevos métodos de higienización de la leche, para suministrarla al público en las mejores condiciones sanitarias, nos sugirieron el trabajo que hoy tenemos el honor de presentar en esta sesión, cuyo primer informe privado fué entregado el 4 de julio de 1952 y cuya parte fundamental se ha dado a conocer en el VI Congreso Internacional de Microbiología celebrado en Roma en septiembre de 1953.

Mi gratitud a ambos y de modo especial al Profesor Vilas, que con tantas consideraciones me acoge en su Laboratorio del Instituto de Edafología del C. S. I. C.

Con la publicación del Decreto referido, los Ministerios de Gobernación y de Agricultura dieron el 31 de julio de 1952 una Orden conjunta conteniendo el reglamento por el que habían de concretarse las condiciones de la leche destinada al abastecimiento público y de las centrales lecheras. Fijando nuestra atención, de su parte dispositiva, sólo en el capítulo primero, relativo a leches de consumo inmediato, en el artículo 2.º las clasificaba «a todos los efectos en tres tipos: leche natural, leche certificada y leche higienizada». En lo referente a esta última, nos

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles, en Madrid, el día 21 de diciembre de 1953.

encontramos que en su artículo 12.º, limitando sus caracteres, dice así: «La leche higienizada cumplirá, obligatoriamente, con las siguientes condiciones referentes a su preparación y venta:

a) Partir de la leche natural, con las características fijadas en el artículo 3.º, excepto el tiempo de redución, que será de tres horas como mínimo.

b) La limpieza previa de la leche por medio de filtros o centrifuga.

c) El calentamiento uniforme de la leche, bien entre el mínimo de 62º C. y el máximo de 65º C. durante no menos de treinta minutos, o bien a los mínimos, de 71,5º C. y quince segundos. Estas relaciones de temperatura y tiempo no excluyen otras que demuestren ser igualmente eficaces, así como tampoco quedan excluídos otros procedimientos de higienización que se autoricen previamente por los Ministerios de la Gobernación y de Agricultura.

d) Después de la higienización, la inmediata refrigeración a menos de 8º C. seguida de su envasado definitivo en recipientes limpios, esterilizados y convenientemente precintados para asegurar la total protección contra contaminaciones y falsificaciones.

e) La conservación, en todo momento, a temperatura no superior a 8º C. hasta su entrega al consumidor.

f) Que su venta se efectúe dentro de las treinta y seis horas siguientes a la higienización.

g) La terminante prohibición de la repasteurización de la leche, del envasado y cerrado manuales, y del embidonado, embotellado y cierre fuera del Centro higienizador.»

Y en su artículo 11 (alteraremos el orden en honor a su proceso de producción) dice así: «La leche higienizada será entregada al consumo con las características de composición señaladas para la leche natural, y en lo que se refiere al recuento de bacterias viable en placa, fija como límite el de 100.000 colonias por centímetro cúbico.»

PARTE TEORICA

Desde el punto de vista de la acción de ondas luminosas sobre las bacterias, son de todos bien conocidos los efectos bactericidas de la luz solar en el gran campo de la microbiología patológica, efectos tan recogidos des-

de los tiempos más remotos, que es raro el idioma que en su refranero no consagre alguna frase que exalte esta cualidad, y que en el rico y bello refranero español se la perpetúa con la clásica frase «Donde entra el sol no entra el médico.» Paralelamente con el conocimiento de las bacterias como agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas se suceden los trabajos en este sentido. Downes y Brull, hacia 1878, mantienen estéril un líquido putrescible por su exposición a la luz del sol; Duclaux (1886) demuestra la mayor fragilidad de las formas vegetativas, y Roux observó poco más tarde que, no obstante su mayor resistencia, las esporas del carbunco eran destruídas por los rayos solares en un plazo no mayor de veinticuatro horas en tubo cerrado conteniendo bastante cantidad de aire.

Se registran numerosos trabajos de experimentación y se discriminan qué longitudes de onda del espectro solar poseen mayor efecto bactericida.

Barr, hacia 1923, demuestra la acción perjudicial de las ondas ultravioletas, incluso sobre protozoos y tejidos de animales y plantas.

En la escala de ondas electromagnéticas sabemos, por los trabajos de Spencer, Clark, Wirckoff y Rivers y por los de Dubois y Bruynoghe, la acción bactericida de los rayos cósmicos, rayos gamma y rayos X.

Por otra parte, Liu y colaboradores estudian el efecto bactericida de las ondas sónicas y supersónicas, activas no sólo sobre bacterias, sino también sobre algunos bacteriófagos, como los correspondientes al coli.

También se estudian los efectos de la corriente eléctrica continua sobre las bacterias, y las investigaciones de Spacth y las de Apostoli y Laquerriere concluyen que, su escaso poder bactericida, era atribuíble a la descomposición del electrolito que liberaba, según su composición, cloro, oxígeno u otros iones nocivos para las bacterias.

Beattie y Levin en el año 1920 estudian el efecto de las corrientes de baja frecuencia con potenciales hasta de 4.000 voltios y dos amperios de intensidad, logrando un marcado efecto bactericida.

D'Arsoinval en 1893-96 inicia el estudio de la acción de las corrientes de alta frecuencia sobre las bacterias y a partir del año 1932-36, en que Szymanowki, Fabián y otros vuelven a ocuparse de ellas, no hemos encontrado nuevas observaciones en este sentido.

PARTE EXPERIMENTAL

En nuestros trabajos, hemos efectuado ensayos encaminados a observar la acción bactericida de la radio-frecuencia sobre la leche de vacas, con el fin de comprobar si sus efectos eran aprovechables para la higienización de la misma.

Para ello realizamos ensayos sobre distintas muestras de leche recogidas de diferentes establos, con contenido bacteriológico distinto y sometiéndolas, como se describe a continuación, a la acción de un equipo de radiofrecuencia instalado en el Instituto Leonardo Torres Quevedo, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por el Ingeniero de Telecomunicación señor Jiménez.

El equipo en cuestión ha funcionado en una longitud de onda de treinta metros (10 megaciclos por segundo) y una potencia de 80 watios.

Al objeto de comprobar las temperaturas alcanzadas por la leche durante su tratamiento por radio-frecuencia se ha utilizado un par termoeléctrico de gran sensibilidad.

Estas experiencias, se han realizado en dos series; la serie M-100, que se refiere a leches procedentes de establos próximos al Laboratorio, en las que ha transcurrido poco tiempo entre el ordeño y el momento de someterlas a la acción de radio-frecuencia, y la serie M-200, que pertenecen a muestras de leche procedentes de establos más distantes, con contenido bacteriológico más elevado.

Tratamiento de las leches.—De cada una de las muestras ensayadas se han colocado en tubos de vidrio estériles (15 × 150 mlt.) 15 centímetros cúbicos de leche, dejando parte de ellos taponados, como testigos, y el resto se ha sometido a la acción de la radiofrecuencia en tiempos diferentes y hasta alcanzar temperaturas distintas, según se indican en el cuadro siguiente. Para su radiación se han colocado los tubos en soportes aislantes y se han aplicado los polos del oscilador abrazando al tubo por su parte exterior en los límites superior e inferior de la columna de leche formada, al mismo tiempo que el par termoeléctrico colocado en el interior del tubo y en el centro de la columna de líquido nos ha ido indicando las temperaturas alcanzadas y en cuyas máximas consignadas a continuación sólo han permanecido durante diez segundos.

Los tiempos empleados en las radiaciones han oscilado entre cuatro y

catorce minutos, no habiéndose prolongado éstos, ya que la temperatura de 80° C. sobrepasa el límite fijado por la legislación y provocaría una alteración en las condiciones alimenticias de la leche por su disminución en el contenido vitamínico y modificación de la fracción proteínica de la misma.

Todas las muestras, tanto radiadas como no radiadas, han sido conservadas rápidamente en la nevera hasta el momento de la comprobación bacteriológica.

Comprobación bacteriológica.—Para apreciar el contenido basteriológico de cada una de las muestras (radiadas y testigos) se ha utilizado «La determinación de los tiempos de reductasa» y «El recuento de bacterias viables en placa», según las técnicas dadas en los Métodos Standard para el examen de productos de lechería de U. S. A., haciendo estos recuentos a distintas diluciones y efectuando la lectura de las placas a las cuarenta y ocho horas de estancia en la estufa a 37° C.

Resultados.—Se recogen en las tablas siguientes las cifras medias de los resultados obtenidos:

SERIE M-100		TRATAMIENTOS		RESULTADOS	
N.°	Caracteres	Tiempo de radiación	Temperatura máxima	Tiempo de reductasa.	Cifra media de colonias al c. c.
100	no radiadas	—	—	1 h. 30' mit	2.695.000
150	radiadas	4'mit.	50° C.	3 h. 45' »	720.000
160	radiadas	5-1/2	60° C.	5 h. 30' »	74.000
165	radiadas	7 »	65° C.	5 h. 30' »	87.000
170	radiadas	8-1/2	70° C.	5 h. 45' »	77.000
175	radiadas	11'	75° C.	5 h. 30' »	158.000
180	radiadas	14'	80° C.	5 h. 45' »	70.007

SERIE M-200		TRATAMIENTOS		RESULTADOS	
N.°	Caracteres	Tiempo de radiación	Temperatura máxima	Tiempo de reductasa	Cifra media de colonias al c. c.
200	no radiadas	—	—	1 h. 45' mit	4.230.000
250	radiadas	4' mit.	50° C.	3 h. 15' »	1 560.000
260	radiadas	5-1/2»	60° C.	5 h. 45' »	200.000
265	radiadas	7' »	65° C.	5 h. 30' »	320.000
270	radiadas	8-1/2»	70° C.	5 h. 30' »	316.000
275	radiadas	11' »	75° C.	5 h. 15' »	400.000
280	radiadas	14' »	80° C.	5 h. 15' »	635.700

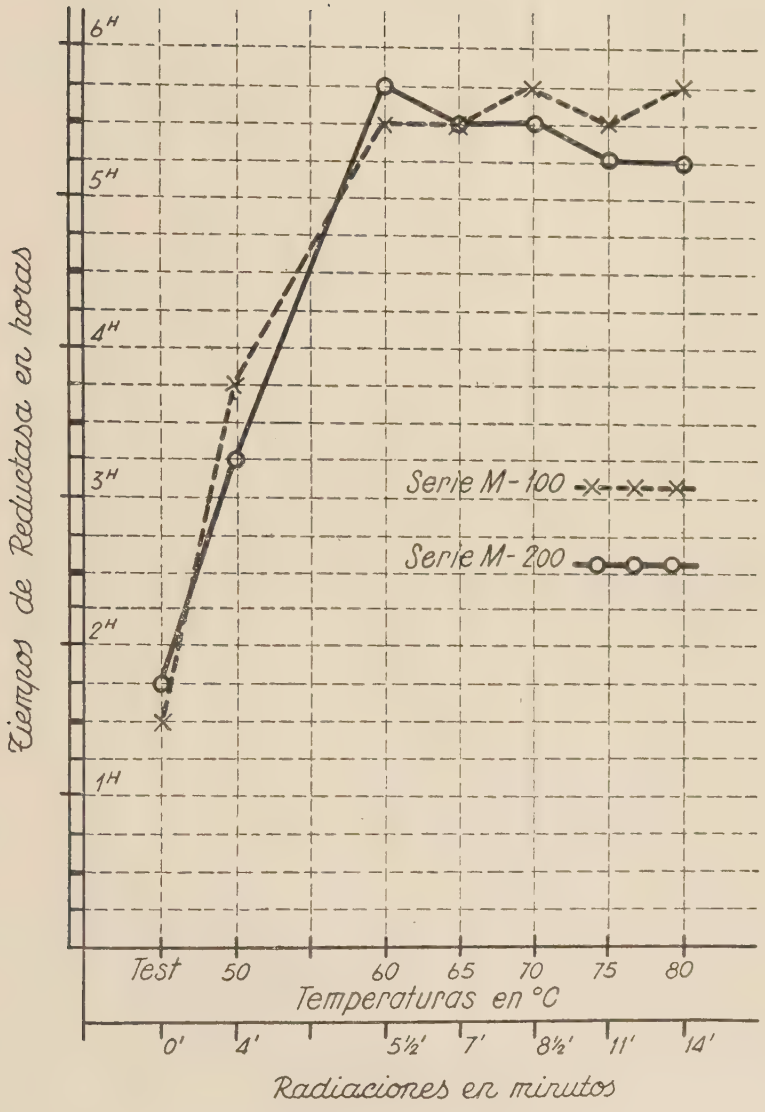
Estos valores recogidos gráficamente nos dan las curvas que se insertan más adelante.

Discusión.—Teniendo en cuenta las cifras contenidas en los cuadros que preceden y recordando las condiciones fijadas en el reglamento de 31 de julio de 1952, que para efectuar la higienización, exige partir de leches cuyo tiempo de reductasa no sea inferior a tres horas, observamos que en ambas series, no obstante utilizar muestras de leches con tiempo de reductasa muy inferior al admitido, ha sido suficiente un tratamiento por radio-frecuencia de sólo cuatro minutos, para mejorar con creces el límite fijado a las leches higienizadas (dos horas) y todo ello sin sobrepasar la temperatura de 50° C. Estos tiempos de reductasa se elevan aún más (cinco o más horas) cuando la acción de radio-frecuencia se sostiene cinco-seis minutos, sin pasar la temperatura de 60° C.

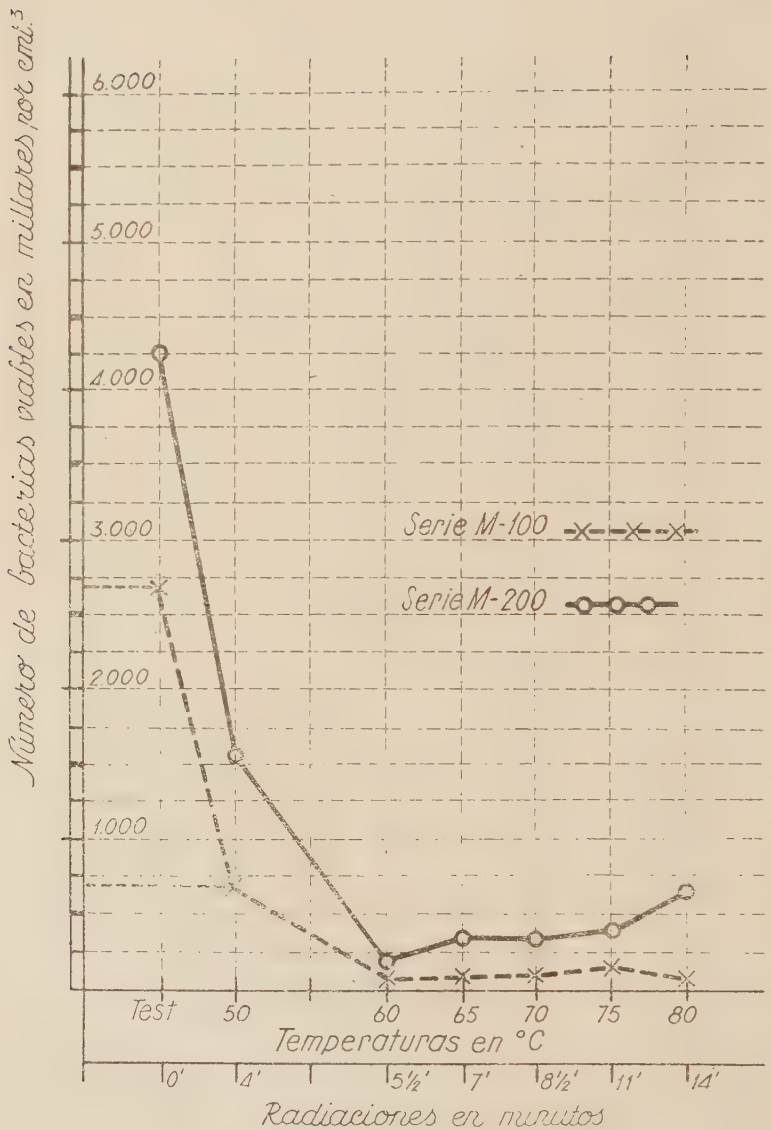
En lo que se refiere al recuento de bacterias viables en placa, en la serie M-100 se observa un descenso rápido, consiguiéndose a los cinco-seis minutos cifras inferiores a las 100.000 colonias por c. c. que fija el reglamento, y en cuanto a la serie M-200, aunque no ha alcanzado el límite anterior, por tratarse de muestras de leche extraordinariamente contaminadas, se logra un descenso en su contenido microbiano superior al 95 por 100.

Por otra parte, y en las dos series, se observa que, una vez llegados a los 65° C., el poder bactericida de la radio-frecuencia no aumenta sensiblemente, aunque las temperaturas lleguen a los 75° C. u 80° C., dato éste que, unido a la ausencia de fenómenos electrolíticos, por estar los polos

GRAFICA I


6H
5H
4H
3H
2H
1H
Tiempos de Reductasa en horas
Serie M-100
Serie M-200
Test
50
60
65
70
75
80
Temperaturas en °C
0'
4'
5½'
7'
8½'
11'
14'
Radiaciones en minutos

GRAFICA II


Número de bacterias viables en millares por cm.³
6.000
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
Serie M-100
Serie M-200
Test
50
60
65
70
75
80
Temperaturas en °C
0'
4'
5½'
7'
8½'
11'
14'
Radiaciones en minutos

del oscilador al exterior del tubo de vidrio y sin contacto directo con la columna de leche, nos induce a pensar que el efecto bactericida apreciado puede ser atribuído en su mayor parte a la vibración provocada en toda la masa de leche por el paso de las radio-ondas, independientemente del efecto térmico momentáneo ocasionado por la discreta elevación de la temperatura.

Con el deseo de comprobar extremos de este trabajo iniciado, no totalmente aclarados, esperamos la instalación de un nuevo equipo de radio-frecuencia de mayor potencia que nos permita continuar estas investigaciones y lograr, si ello nos es posible, conocer exactamente la acción bactericida de la radio-frecuencia, de modo especial sobre las bacterias de tipo patógeno, cuyo vehículo más frecuente sea la leche.

CONCLUSIONES

Como resultado de estos trabajos preliminares y hasta nuevas investigaciones, creemos deducir las siguientes conclusiones:

1.ª Con el tratamiento de la leche por radio-frecuencia, durante cuatro minutos, se reduce el contenido bacteriano de la misma en un 75 por 100.

2.ª Esta disminución llega al máximo de 97 por 100 a los cinco o seis minutos de radiación y sólo una elevación de temperatura de 60-65° C. durante diez segundos.

3.ª No se consigue mayor efecto bactericida aunque se prolongue el tiempo de acción de la radio-frecuencia y se alcancen temperaturas de 75-80° C.

4.ª Los hechos experimentales que se consignan podrían ser aplicables a la higienización industrial de la leche.

LUODIAGNOSTICO POR LA REACCION DE FIJACION DEL COMPLEMENTO CON SUSPENSION DE TREPONEMAS DE REITER (*)

por

F. Moreno de Vega.

Si bien los progresos del suerodiagnóstico de la sífilis han sido muy considerables a partir de los trabajos de Wassermann en 1906, culminando en las aportaciones de Pangborn con la obtención del fosfolípido denominado cardiolipin, todo lo conseguido ha estado comprendido dentro de la investigación de las reaginas; es decir, fuera del mecanismo inmunológico genuino. No obstante, el intento de lograr pruebas específicas no ha sido nunca abandonado, habiéndose trabajado mucho tratando de descubrir anticuerpos, como los aglutininas, por ejemplo, sin haber obtenido resultados aprovechables.

Sachs, Klopstock y Weil, en 1927, sostuvieron lo que modernamente va adquiriendo consistencia: que los treponemas disgregados en el organismo del enfermo liberen substancias generadoras de anticuerpos genuinos, compuestas de un hapteno, asemejable a los extractos lipoideos al uso, y de una proteína proveniente del suero. Eagle y Hoeltzer señalan, como generador del anticuerpo específico, un partígeno lipoideo del treponema, el cual existe, indudablemente, en el treponema pálido, comprobándose por los autores citados y por la escuela italiana, en la estirpe treponémica de Reiter.

En el hallazgo de aglutininas puso gran empeño Touraine, sin resultados positivos. Más Turner (1931), si no logró triunfar en esto, sí consiguió sistematizar las condiciones óptimas para atenuar los treponemas virulentos de la estirpe Nichols, demostrando que la mezcla de éstos con

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 8 de febrero de 1954.

el suero problema y el complemento, inoculada intradérmicamente al conejo, producía o no chancro, según que el suero examinado no contuviera anticuerpos o fuera portador de ellos, y abrió con ello un camino a sus discípulos Nelson y Mayer, que han puesto a punto una prueba llena de interés científico y que permite, por la mezcla de los tres factores que intervenían en la prueba propugnada por su maestro, demostrar la existencia de anticuerpos inmovilizantes. La prueba de Nelson-Mayer parece ser la más específica que se conoce.

Existe una prueba biológica de gran interés, muy específica y sensible, y que está muy poco difundida. Consiste en la reacción de fijación del complemento, utilizando como antígeno una suspensión de treponemas de la llamada estirpe de Reiter, germen que está privado de poder patógeno, pero que conlleva partígenos inmunológicamente superponibles a los de la estirpe patógena. Este suero-diagnóstico fué propuesto por Gaehtgens en 1929. La estirpe de Reiter, según Muster (5), fué aislada en 1922 por Wassermann y Ficker, denominándose entonces estirpe de Ficker, y cuando se posesionó de ella Reiter pasó a ser propiedad del Instituto Sueroterápico de Saxe.

La estirpe treponémica en cuestión tiene, según Eagle y Hogan, y también según nosotros, diferencias morfológicas con la estirpe genuina obtenida del chancro, aparte la diferencia de patogenicidad señalada anteriormente. También se diferenciarían en que el **t. pálido** destruye la diastasa, y el **t. Reiter,** no.

Gaehtgens admitió que en el suero sifilítico había una reagina no específica que fijaba el complemento en presencia de los extractos de órganos y un anticuerpo específico que lo haría en presencia del treponema de Reiter. Como testimonio de tal aserto adujo los siguientes hechos:

a) Los sueros sifilíticos calentados a 63° reaccionan positivamente con el antígeno treponémico de Reiter, pero no con los extractos de órganos.

b) Los animales debidamente inmunizados con suspensiones de treponemas de Reiter, ostentan en su sangre substancias que fijan el complemento con dichas suspensiones, pero no con extractos de órganos.

c) Si se adsorbe un suero sifilítico con suspensión de treponemas de Reiter deja aquél de fijar el complemento con dicha suspensión, haciéndolo con los extractos. También señaló que dichos sueros específicos

adsorbidos con fragmentos de órganos, siguen fijando el complemento en presencia del treponema de Reiter, mas no con extractos de órganos.

Eagle y Hogan, en sus experiencias, no obtuvieron resultados iguales a los expresados, observando que el calentamiento a 63° durante plazos oscilantes entre tres y ciento veinte minutos privaba a los sueros sifilíticos de su aptitud para fijar el complemento, tanto en presencia de treponema de Reiter como de extractos de órganos, y que el suero de los conejos inmunizados con treponema de Reiter reaccionaba positivamente con treponemas de Reiter y con extractos de órganos. Finalmente, adsorbiendo los sueros específicos de enfermos sifilíticos con treponema de Reiter, se les privaba de fijar el complemento con treponema de Reiter y extractos de órganos, siendo así que si se adsorbían con los extractos, dejaban de reaccionar con éstos, mas continuaban haciéndolo con las suspensiones treponémicas de Reiter.

Sin embargo, Eagle y Hogan no negaron el interés diagnóstico mediante la prueba de reacción de fijación del complemento con antígeno treponémico de Reiter, admitiendo que en los treponemas de Reiter hay fracciones antigénicas capaces de reaccionar específicamente con los sueros de los sifilíticos y que estarían ausentes de los extractos de órganos; y la superioridad antigénica de las suspensiones treponémicas sobre los extractos.

Los trabajos de Eagle y Hogan datan del año 1940.

D'Alessandro y sus colaboradores empezaron a publicar trabajos atinentes a este tema en 1941, evidenciando, en primer lugar, que los sueros sifilíticos adsorbidos por los antígenos lipoideos quedaban privados de fijar el complemento con el mismo antígeno; pero continuaban fijándole si actuaba como tal una suspensión de treponemas de Reiter y, además, que la adsorción por el antígeno de Reiter privaba al suero de ambas especies de anticuerpos.

A estos trabajos, que pudiéramos llamar preliminares, de D'Alessandro y de Blasi, siguieron otros de la misma escuela italiana, que han sido practicados en los últimos años y que han supuesto una aportación extraordinariamente interesante (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9). En resumen, los italianos han llegado a demostrar cuatro partígenos en el treponema de Reiter:

a) Antígeno proteínico **termolábil**, que se destruye a 76-78°.
b) Antígeno de naturaleza de polisacárido, **termoestable**.
c) Antígeno lipoideo ubicuo.

d) Antígeno lipoideo diferenciable del ubicuo y similar al antígeno cerebral de Witebsky.

Lo más significativo y útil de estos hallazgos estriba en las analogías inmunológicas que existen entre los partígenos del treponema pálido genuino y los del treponema de Reiter, porque en el suero de los sifilíticos se encuentran anticuerpos para los partígenos citados (además del anticuerpo antilipoideo floculante) (*), a saber:

Un anticuerpo antitreponémico termolábil TL.

Un anticuerpo termoestable TE.

Un anticuerpo antilipoideo L.

De todos ellos el más importante es el antígeno termolábil porque las experiencias clínicas acreditan que la presencia del anticuerpo correspondiente es el testimonio que mejor revela la existencia del treponema pálido en el organismo (Puccinelli), adquisición que ha sido posible mediante la obtención por D'Alessandro y Dardanoni del antígeno proteínico termolábil en gran estado de pureza (3), partiendo del treponema de Reiter; con el cual las reacciones con los sueros sifilíticos podrían diputarse como las reacciones de grupo de análoga significación biológica a las reacciones cruzadas en el terreno de las rickettsiosis y de las salmonelosis, por ejemplo. No todas las estirpes del treponema de Reiter están provistas de la misma proporción del partígeno lipoideo, conviniendo las que contengan menos, como acontece con la estirpe de que disponemos que está prácticamente desprovista de él y que redunda en beneficio de la especificidad de las pruebas serológicas pertinentes.

Puccinelli, sintetiza así las observaciones en el terreno clínico:

El anticuerpo contra el partígeno termolábil es el primero en aparecer en la sífilis primaria (3.º al 5.º día del chancro); luego surge el termoestable, haciéndolo en último lugar los antilipoideos revelables por los extractos de órganos normales.

En la sífilis secundaria reciente todos los anticuerpos se hacen bien patentes.

En la sífilis secundaria tardía y en la terciaria y en la neurosífilis, se encuentra siempre el antitermolábil.

En la sífilis latente (enfermos tratados) se observa frecuentemente el anticuerpo termolábil y cuando aparece coincidiendo con ausencia de

(*) Parece ser que los anticuerpos que fijan el complemento y los que intervienen en la floculación (ambos antilipoideos) son diferentes.

todo signo clínico (15%) podría interpretarse, según Puccinelli, como el «eco serológico» de una función genética residual del anticuerpo, aun después de desaparecer el espiroqueta; casos que deben juzgarse con circunspección considerando a los pacientes como portadores del germen.

En la sífilis congénita predominan los anticuerpos lipoideos.

Como resultado del tratamiento, el anticuerpo termoestable es el primero en desaparecer. La desaparición de los otros anticuerpos está ligada al período de contagio y a la gravedad de la sintomatología. Así en la sífilis recientemente adquirida, con signos de actividad, desaparece primero, por lo común, el antilipoideo; en la sífilis reciente (chancro) algunas veces desaparece primero el antitermolábil y en la sífilis antigua con pequeños o nulos signos clínicos, el antitermolábil es el primero en desaparecer.

Son excepcionales las falsas reacciones con el antígeno treponémico.

El antígeno treponémico completa, pues, el diagnóstico serológico

Todos los conocimientos contemporáneos inclinan a aceptar que la presencia exclusiva del anticuerpo lipoideo no permite afirmar la existencia de sífilis activa, dando a entender, la revelación del anticuerpo antitreponémico, la persistencia del espiroqueta de Schaudinn.

El profesor Levaditi (3) mostró aversión al estudio de estos partígenos de la estirpe de Reiter alegando que no se trataba de un germen patógeno. Fué un criterio equivocado porque en el asunto sólo se persigue un fin diagnóstico en el que el hecho bien manifiesto de existir partígenos comunes a las estirpes patógenas y no patógenas presta utilidad, sobre todo por lo que se refiere a la fracción termolábil, para la práctica clínica de la reacción de fijación del complemento. No quiere decir esto, naturalmente, que el treponema de Reiter y el treponema pálido tengan idéntica constitución. Porque esto no es así, el treponema de Reiter no conviene a la prueba de Nelson. Pero lo que sí puede afirmarse es que hay partígenos comunes que prestan un servicio de incalculable valor diagnóstico y, como aducen D'Alessandro y Dardanoni, ante la complejidad constitucional del treponema pálido patógeno, el organismo reacciona con anticuerpos entre los que descuellan con nitidez el antilipoideo, el antiprotéico y el inmovilizante.

Es verdaderamente curioso que una reacción como la que nos ocupa, que en 1929 propugnó Gaehtgens y que en 1942, Irene Muster, de la Clínica Dermatológica Universitaria de Ginebra, la consideró como la de ma-

yor especificidad (70 %), que con más frecuencia se comportaba como positiva aisladamente en la sífilis (7, 6) y que acusaba una exigua positividad no específica (0,88 — 0,60 %) y, finalmente, que ha sido estudiada con detalle por la escuela italiana, no haya tenido mayor difusión. De este criterio participan Charpy y Ranze, de Marsella, quienes dicen que sería de desear que dicha reacción estuviera más difundida en su patria.

Muy recientemente se han emprendido estudios conducentes a una sistematización diagnóstica basada en la presencia o predominio de alguno o algunos de los anticuerpos que conlleva el suero de los sifilíticos (6, 7, 8 y 9) cuya realización práctica en el laboratorio hará algo más compleja la labor del serólogo.

Hoy por hoy el empleo del antígeno total de Reiter, por su gran contenido en TL, constituye una prueba inmunoquímica que informa mejor que ninguna otra, aparte la de Nelson, de la presencia en el organismo del treponema pálido. En cambio, la presencia solamente de anticuerpos antilipoideos, debe valorarse prudentemente, en ausencia de los otros anticuerpos, antes de afirmar la existencia de lesiones específicas.

TECNICA

Es sencilla. Como antígeno se emplea una suspensión de espiroquetas de la estirpe de Reiter, cuya morfología y aptitudes tintóreas difieren algo de la estirpe patógena de Schaudinn y en cuya parte líquida reside una buena proporción de materia activa, especialmente una vez transcurrido algún tiempo de la obtención del antígeno.

Nosotros operamos con una estirpe dotada de exigua cantidad de partígeno lipoideo y, por consiguiente, los resultados positivos que obtenemos son debidos, de un modo exclusivo, prácticamente, a la presencia de anticuerpos TL y TE; obteniendo por nosotros mismos los cultivos y las suspensiones antigénicas que comprobamos con las preparaciones patrones italianas.

Procedemos simultaneando una reacción de fijación del complemento con antígeno treponémico con otra en la que interviene un antígeno lipoideo, practicando, por otra parte, las reacciones de Kahn, M. K. R. II. y, a veces, la del Citocol.

Hacemos la titulación del complemento en función del antígeno y de

un suero negativo, utilizando para la fase de fijación el método mixto, o sea media hora en la cámara frigorífica y media hora en el baño de 37°.

Solución salina.—Se prepara disolviendo 8,5 grs. de cloruro sódico puro en 1.000 c. c. de agua destilada y se esteriliza a 110°. Deben emplearse soluciones de reciente preparación.

Antígeno.—Se emplea puro, s i n d i l u i r, agitando enérgicamente el frasco antes de recoger las dosis que hayan de utilizarse.

Complemento.—Se diluye en la proporción de 1 c. c. de suero por cada 9 c. c. de solución salina.

Suero hemolítico.—Se emplea una dilución que contenga 8. m. h. por c. c.

Glóbulos rojos.—Se utiliza una suspensión al 5 %.

Precisa titular el complemento en función del sistema hemolítico y en función del antígeno y de un suero humano negativo calentado a 56° durante 30'.

Titulación previa del complemento.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Sol. de compl. al 1/10	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
Mezcla de susp. de glóbulos rojos al 5% y de s. hem. con 8 u. h. por c.c.	1	1	1	1	1	1	1	1
Sol. salina	0,95	0,90	0,85	0,80	0,75	0,70	0,65	0,60

Se sumergen los tubos durante media hora en un baño de agua a 37°.

La dosis mínima que produzca hemolisis total, o la dosis inmediata superior, se elige como punto de partida para la titulación del complemento en función del antígeno y de un suero negativo. Suponiendo que dicha dosis sea 0,10, se procederá así:

Titulación del complemento en función del antígeno y de un suero negativo.

	1	2	3	4	5
Suero negativo (inactivado a 56°)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Antígeno treponémico puro agitado	0.25	0,25	0,25	0,25	0.25
Complemento 1/10	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
Solución salina	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35

Se llevan los tubos a la refrigeradora durante 30' y a continuación se mantienen durante otros 30' en un baño de agua de 37°.

Mezcla de susp. de glób. rojos al 5 % y de suero hemolítico con 8 u. h. por c. c. ...	1	1	1	1	1

Se sumergen los tubos durante 30' en un baño de agua a 37°.

La dosis de complemento mínima que permita una hemolisis total, o la inmediata superior a ésta, será la elegida para la prueba propiamente dicha. Así, si hay hemolisis total en el tubo núm. 3, se puede elegir como dosis complementaria 0,20 ó 0,25 de la solución al décimo de complemento.

Prueba propiamente dicha.

	1	2
Suero problema (inactivado a 56°)	0,1	0,2
Antígeno treponémico puro agitado	0,25	0,00
Complemento 1/10	0,20	0,20
Solución salina	0,45	0,60

Se llevan los tubos a la refrigeradora durante 30' y a continuación se mantienen durante otros 30' en un baño de agua a 37°.

Mezcla de suspensión de glóbulos rojos al 5 % y de suero hemolítico con 8 u. h. por c. c.	1	1

Se sumergen los tubos durante media hora en un baño de agua a 37°.

Se hacen dos lecturas: una al sacar los tubos del baño y otra a las doce o veinticuatro horas de permanencia de éstos en la refrigeradora.

Precisa que haya hemolisis total en el tubo núm. 2. De no ser así, la reacción no tendría valor por tener el suero un alto poder anticomplementario que habría que determinar en su cuantía para realizar de nuevo la prueba final.

Nuestra experiencia no alcanza todavía al número de observaciones necesarias para adoptar un criterio. En la actualidad trabajan algunos sifiliólogos con el antígeno de nuestra obtención, y esperamos que en pocos meses dispongamos de los datos requeridos para pronunciarse en un sentido o en otro; más, con todo, sí podemos afirmar que la reacción expuesta constituye una aportación complementaria de gran valor, de gran especificidad y basada en un mecanismo que, por ser distinto que el que interviene en las pruebas serológicas con antígenos lipoideos, debe ser tomada en consideración y estudiada detenidamente.

Agradecemos profundamente al profesor d'Antona la iniciación de los trabajos pertinentes y la nutrida suma de datos prácticos que tan amablemente nos proporcionó.

Hemos de citar, también con reconocimiento, a los doctores Puccinelli, de la Clínica Dermosifilopática de Sassari y D'Alessandro, Director del Instituto de Higiene de la Universidad de Palermo, por la entrega de sus trabajos y de aportaciones bibliográficas.

Finalmente, hemos de consignar nuestra gratitud al profesor A. de Barbieri, del Instituto Belfanti, que tuvo la gentileza de facilitarnos la fracción protéica termolábil en unión de muy valiosas orientaciones bibliográficas.

RESUMEN

La reacción de fijación del complemento con antígeno treponémico de la estirpe cultivable de Reiter, constituye una prueba c o m p l e m e n t a r i a; no en el sentido de las floculantes ó de las reacciones de fijación con antígeno lipoideo, sino en el de la especificidad, por las analogías existentes entre los partígenos del treponema de Reiter y del treponema de Schaudinn.

BIBLIOGRAFIA

(1) **D'ALESSANDRO, ODDO, COMES** y **DARDANONI.**—1949. **Riv. Ist. Sier. Ital.** 24, núm. 3.

(2) **D'ALESSANDRO, ODDO** y **DARDANONI.**—1950. **Jour. of Vener. Dis. Inform.** Diciembre.

(3) **D'ALESSANDRO** y **DARDANONI.**—1952, **Riv. Ist. Sier. Ital.** 27, 153.

(4) **CHARPY.**—1953. Le T. P. I. Test de Nelson-Mayer.

(5) **MUSTER.**—1942. **Dermatológica.** 86, 351.

(6) **PUCCINELLI.**—1951. **Amer. Jour. of Syph. Gono. and Vener. Dis.** 85, 340-349.

(7) ——— 1951. **Actas del XXXVIII Congreso de la Sociedad Italiana de Dermatología y Sifiliografía.** Vol. II.

(8) ——— 1952. **Brit. Journ. of Vener. Dis.** 28, 184.

(9) ——— 1953. **Sem. des Hop. de Paris** (Arch. de Biol. Med.) núm. 3, 22 septiembre.

NUEVA APORTACION AL ESTUDIO DE LA DETERMINACION BIOLOGICA DE LOS EFECTOS DESNATURALIZANTES DE LA ACCION PROTEASICA SOBRE LOS SUEROS ANTITOXICOS (*)

por

F. Moreno de Vega.

La diferencia de comportamiento entre los sueros equinos no modificados y los modificados por acción encimática y desprovistos, en lo posible, de proteína no específica, en cuanto a las aptitudes sensibilizantes y desencadenantes, apreciadas experimentalmente en el cobayo, «in vivo» e «in vitro», y, por otra parte, el distinto comportamiento de unos y otros productos por lo que afecta al terreno clínico: concretamente a la enfermedad del suero (E. S.), nos indujo a tratar de sistematizar los resultados con aplicación a un método que permitiera deducir si una preparación determinada era adecuada o no a los efectos de su empleo en la terapéutica.

En un trabajo anterior (1) decíamos que las pruebas biológicas basadas en los poderes sensibilizante y desencadenante determinados por el ensayo «in vivo» y por el método de Schultz-Dale, permitían afirmar que cuando dichos poderes estaban disminuídos o anulados, las preparaciones globulínicas ensayadas carecían de aptitud para producir la enfermedad del suero (fenómenos séricos secundarios). Tal aserto podemos mantenerle después de varios años de experiencia. Sin embargo, hemos observado que las preparaciones globulínicas sometidas a la acción proteásica pueden no ostentar anulación o modificación profunda de sus aptitudes sensibilizante o desencadenante y gozar, sin embargo, de la ventajosa condición de no originar los fenómenos séricos secundarios.

Por tanto, tenemos que rectificar, en cierto modo, nuestro criterio acerca de la necesidad de exigir la práctica de tales pruebas como requi-

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 8 de febrero de 1954.

(1) F. Moreno de Vega. 1950. Microbiología Española. 3: 43-56.

sito para aceptar terapéuticamente las preparaciones de globulinas enzimáticamente modificadas.

También expusimos en el citado trabajo nuestro propósito de confirmar nuestra suposición de que los beneficiosos resultados obtenidos en la clínica con las expresadas globulinas, radicara en la disminución del volumen de las moléculas proteicas, lo que permitiría una más rápida absorción y una eliminación más acelerada, evitando así que se operara el conflicto antígeno-anticuerpo, porque al formarse las precipitinas no encontraran ya antígeno íntegro, e indicábamos nuestro proyecto de reproducir las experiencias de Voss.

I

PRUEBAS DE ANAFILAXIA EXPERIMENTAL

Anafilaxia «in vivo».

Dosis sensibilizantes.—Se han empleado cobayos de 300-200 grs. de peso, administrándose a unos, por vía subcutánea, la dosis de 1 c. c. de una solución de suero equino al 1/10, y a otros, por vía intraperitoneal, 2 c. c. de una solución de suero equino al 1/50 (= 0,04 de c. c.); en ambos casos observando un período incubatorio de cincuenta días.

Las globulinas modificadas por el fermento se han utilizado en dosis equiproteicas con relación a las dosis de suero expresadas.

Preparaciones ensayadas (1).

Preparación A... ... ... Con 8,13 de proteína por 100. Digestión de suero antidiftérico durante veinte horas a 22° pH = 3, y 2 u. pépsicas por c. c. Adsorción por gel de fosfato cálcico. Precipitación por el sulfato amónico, diálisis, etc. Pérdida de antitoxina = 60 %.

(1) Las expresiones sueros digeridos, globulinas digeridas o fermentadas, sueros encimáticos, fermoglobulinas, etc., son, prácticamente sinónimas. Se trata en todos los casos, en este trabajo, del suero antidiftérico o antitetánico, parcialmente digerido por la acción de la pepsina y el ClH, separando, previa neutralización del ácido, el fermento y la mayor parte posible de proteína inespecífica por un gel, precipitando, finalmente, las globulinas por acción salina, con ulterior diálisis; es decir, globulinas modificadas por mecanismo fermentativo proteásico.

Preparación B... ... ... Con 3,71 por 100 de proteína. Idénticas condiciones que en la preparación A, a excepción del tiempo de digestión, que fué de veintiocho horas. Pérdida = 60 %.

Preparación C... ... ... Con 6,58 de proteína por 100. Digestión de cuarenta y seis horas. Pérdida = 66 %.

Preparación D... ... ... Con 1,44 de proteína por 100. Cinco días de digestión. Pérdida = 90 %.

Preparación H... ... Con 7,81 de proteína por 100. Digestión de cuarenta y ocho horas a 39°.

Preparación Fermo Dan ... Con 12,27 por 100 de proteína.

Preparación F. H. L1. 1 ... Con el 4 por 100 de proteína.

Preparación Ll usual 2 ... Con el 6,5 por 100 de proteína. Veinte horas de digestión a 22°.

Preparación Ll usual 3 ... Con el 6,7 por 100 de proteína. Veinte horas de digestión a 22°.

Resultados del poder desencadenante «in vivo» del suero equino sobre los animales sensibilizados con globulinas fermentadas.

Vía.. ... ... Intracardíaca.

Dosis de suero equino ... La que produce en los animales sensibilizados para dicho suero, cuando menos, el 75 % de mortalidad, con el cuadro anafiláctico típico. En las experiencias, 0,2 de suero por cada 100 grs. de animal.

Número de animales ensayados por dosis: 10.

Preparaciones	Mortalidad por choque agudo (cifras %)
A (1)	16
B (1)	25
C (1)	0
D (1)	100
H (2)	0
H (1)	0

(1) Sensibilizados por vía subcutánea.
(2) Sensibilizados por vía intraperitoneal.

Fermo. dan.	25
F. H. Ll. 1	40
Ll usual 2	33
Ll usual 3	60
S.	90

Resultados del poder desencadenante de las globulinas digeridas sobre los animales sensibilizados con los mismos productos.

Dosis.—La equiproteica a la de suero equino que produzca la muerte al 75 %, como mínimo, de los sensibilizados al S. E. (1).

Sensibilizados con A	Mortalidad %
Dosis desencadenante de S.. ...	100
Dosis desencadenante H..	66
Dosis desencadenante D..	33
Dosis desencadenante de A.. ...	50
Sensibilizados con B	
Desencadenante D	66
Desencadenante B	55
Sensibilizados con D	
Desencadenante D	95
No sensibilizados	
Desencadenante D	0
Sensibilizados con H (v. peritoneal)	
Desencadenante suero equino ...	100
Desencadenante H	95

(1) S. E. = suero equino.

Sensibilizados con H (v.subcutánea)

Desencadenante suero equino ...	95
Desencadenante H	95

Hemos tomado en consideración solamente la mortalidad para juzgar el resultado de los choques, porque los pequeños signos de intolerancia no son siempre específicos, como lo demuestran nuestras observaciones inyectando a cobayos nuevos, y por vía intracardíaca, el suero equino normal, las fermoglobulinas o el suero humano de convalecientes de fenómenos séricos secundarios.

Hemos visto que cuando se inyecta un c. c. de suero equino a los cobayos no sensibilizados, se suele producir en ellos un síndrome caracterizado por movimientos masticatorios, ligero rascamiento y alguna ataxia, quedando después como indiferentes durante algunas horas.

En los animales nuevos inyectados con una cantidad equiproteica en forma de fermoglobulina digerida por una temperatura de 39°, observamos excitación, ligeras convulsiones clónicas, sin echarse los animales, y estado atáxico; síntomas de breve duración y que se ven seguidos de estado indiferente e inapetencia.

Finalmente, los cobayos inyectados con suero humano de convalecientes de la enfermedad del suero (E. S.) (conservado durante cuatro meses en refrigeradora y adicionado de mertiolato) presentan, de un modo inmediato, estado atáxico, con subsiguiente estado de indiferencia e inapetencia, pereciendo algunos de ellos.

Agerholm Christensen y Kerrich (referencia en Biol. Abst. núm. 21-31-9, noviembre 1948), dicen que los cobayos sensibilizados por el suero fermentado están sensibilizados para el suero normal y, del mismo modo, los sensibilizados por el suero normal lo están para el digerido, reaccionando con «shock» si las dosis son suficientes. Así también han observado los mencionados autores que el suero digerido (pépsico) es más eficiente como desencadenante cuando el animal ha sido sensibilizado para el mismo producto que cuando lo ha sido para el normal, como si el suero fermentado, además de conservar algo de su especificidad original, adquiriera nueva especificidad antigénica como consecuencia de la purificación.

Estos resultados no están en armonía con los que obtuvimos nosotros en su día, pero sí lo están con los expuestos en el presente trabajo.

Resalta claramente la irregularidad de resultados. Por ejemplo, las preparaciones A, B y Ll. us. 2, obraron como desencadenantes con un poder muy inferior al del suero equino, cuando los animales fueron sensibilizados para este producto; las preparaciones C y H no actuaron como desencadenantes y las preparaciones Ll. us. 3 y S. actuaron con un alto poder desencadenante; siendo de advertir que la preparación S (cuya mortalidad desencadenante fué del 90 %) fué obtenida por una autoridad extranjera indiscutible. En cambio, en los animales sensibilizados con sueros fermentados, las preparaciones de la misma condición se comportan, en general, con una mayor eficiencia desencadenante en todos los casos.

ANAFILAXIA «IN VITRO»

Anafilaxia «in vitro» o fenómeno de Schultz-Dale, en el cobayo.—Estas experiencias han sido realizadas (con los cobayos sensibilizados por nosotros, con arreglo a la técnica expuesta) por el Profesor García de Jalón y la Srta. M. García de Jalón, jefe y subjefe, respectivamente, del laboratorio de Farmacología del Instituto Llorente.

Emplearon cobayos de 350-600 grs. de peso, utilizando porciones distales de intestino aislado. Durante los ensayos fueron provocadas contracciones seriadas con histamina a concentraciones de 1×10^{-8} y 2×10^{-8}. Los animales fueron estudiados al cabo de cuarenta y seis días como mínimo y ciento veintisiete como máximo de ser sensibilizados con suero equino o con las preparaciones globulínicas encimáticas.

Los fármacos estudiados se agregaron al baño en dosis equiprotéicas equivalentes a 1,24 miligramos de proteína de suero equino, que es la concentración óptima de dicho producto para suscitar respuestas satisfactorias en el intestino sensibilizado cuando se opera con baño de 10 c. c. Las temperaturas de éste fueron de 32° C.

Las fermoglobulinas ensayadas fueron las mismas que se probaron en los ensayos de anafilaxia «in vivo»:

Preparación A.—Digestión de 20 horas (22°) con 2 u. pépsicas por c. c.
Preparación B.—Digestión de 28 horas (22°) con 2 u. pépsicas por c. c.
Preparación C.—Digestión de 46 horas (22°) con 2 u. pépsicas por c. c.
Preparación D.—Digestión de 5 días (22°) con 2 u. pépsicas por c. c.
Preparación H.—Digestión de 48 horas (39°) con 2 u. pépsicas por c. c.

Preparación H.LL.1. Digestión de 20 horas (22°) con 2 u. pépsicas por c. c.
Preparación F.Dan. Digestión de 20 horas (22°) con 2 u. pépsicas por c. c.

La pepsina utilizada fué de irreprochable calidad, muy purificada, constituída por un polvo blanco nieve, desprovista de pirógenos.

Como ensayo previo se probó el suero equino normal frente a cobayos sensibilizados por él. Un cobayo no reaccionó (¿insuficiente sensibilización ?) y tres provocaron contracciones, de tipo desensibilizante, superiores a las de la histamina (gráfica núm. 5).

Preparación A.	Cobayos sens. con s. equino.	Cobayos sens. con ferm. A.
Adición de fermoglobulina A.	1. c. resp. casi nula (gráf. 2).	2 c. sin respuesta (gráfica núm. 7).
	1. c. resp. igual a la histamina (gráfica núm. 6).	2. c. con respuesta mayor que la histamina (desensibilizante) (gráf. núm. 8).
	1 c. resp. inferior a la histamina (desensibilizante).	
Adición de suero equino.	Respuesta evidente.	Respuesta superior a la de la histamina.

Preparación B.	Cobayos sens. con s. equino.	Cobayos sens. con ferm. B.
Adición de fermoglobulina B.		1 cobayo sin respuesta (gráf. núm. 9).
		1 cobayo con respuesta algo menor que la histamina (t. desensibilizante).
Adición de suero equino.	Respuesta mayor que la histamina.	Respuesta mayor que la de la histamina.

Preparación C.	Cobayos sens. con s. equino.	Cobayos sens. con ferm. C.
Adición de fermoglobulina C.		2 cobayos sin respuesta (gráf. núm. 10).
Adición de suero equino.	Respuesta evidente (desensibilizante).	Respuesta inferior a la de la histamina.

Preparación D. (Digestión de 5 días).	Cobayos sens. con s. equino.	Cobayos sen. con ferm. D.
Adición de fermoglobulina D.	1 cobayo, sin respuesta (gráf. n.º 16).	1 cobayo, sin respuesta (gráf. 11).
	1 cobayo sin respuesta ta (gráf. n.º 16).	2 cobayos con respuesta igual a la de la his-
	2 cobayos con respuesta superior a la histamina.	tamina (desensibilizante (gráf. núm. 13.)
	1 cobayo con respuesta igual a la de la histamina (gráf. número 3.)	
	1 cobayo con respuesta inferior a la de la histamina (desensibilizante).	
Adición de suero equino.	Respuesta superior a la de la histamina (desensibilizante).	Respuesta inferior a la de la histamina (gráfica núm. 12.)

Preparación H.	Cobayos sens. con s. equino.	Cobayos sen. con ferm. H.
Adición de fermoglobulina H.	Respuestas iguales, unas veces, otras inferiores y otras superiores a las de la histamina (desensibilizantes) (gráf. número 1). Las respuestas no se influencian por la adición previa de suero equino.	
Adición de suero equino.	Respuesta superior a la de la histamina.	Pruebas inespecíficas (véase después apartado Prep. H ensayada en cobayos no sensibilizados).

Preparación H.Ll.1	Cobayos sens. con s. equino.	Cobayos sen. con ferm. H.Ll.1.
Adición de fermoglobulina H.Ll.1.	1 cobayo, sin respuesta (gráfica n.º 14). 1 cobayo, con respuesta mayor que la de la histamina (gráfica n.º 15).	
Adición de suero equino.	Respuesta evidente, a veces mayor que la de la histamina (desensibilizante).	

Preparación F. dan.	Cobayos sens. con s. equino.	Cobayos sens. con ferm. F. dan.
Adición de fermoglobulina F. dan.		1 cobayo con respuesta superior a la de la histamina (desensibizante) (gráf. núm. 6). 2 cobayos con respuestas del 30-50 % de las de histamina (desensibilizante).
Adición de suero equino.	Respuesta superior a la de la histamina.	Respuesta superior a la de la histamina.

Preparación Fermo. H.	Cobayos no sensibilizados con proteínas.
Adición de suero equino.	Ninguno de los animales da respuesta.
Adición de Fermo H.	Los animales dan respuesta del mismo tipo que los sensibilizados con suero equino normal (presencia de substancias inespecíficas), (Véase gráfica núm. 5.)

La cuantía de las respuestas acusa en general una diferencia entre la acción de las globulinas fermentadas y del suero equino bruto sobre el intestino de los cobayos sensibilizados con este producto; pero sin regularidad ni constancia.

En los intestinos de animales sensibilizados con globulinas digeridas, los resultados son más favorables con los productos homólogos desencadenantes, pero no en todos los casos. Además, en el intestino de animales sensibilizados con dichas preparaciones, el suero equino produce, en ocasiones, respuestas superiores a las de la histamina.

En todas estas experiencias se dan con harta frecuencia respuestas de tipo desensibilizante (véanse las gráficas).

Es de hacer notar la observación del profesor García de Jalón (gráfica núm. 7) demostrativa de la acción inespecífica de la preparación H (globulina digerida a 39º) puesto que produce respuestas, en intestino

de animales no sensibilizados, iguales a las originadas en cobayos sensibilizados para el suero equino normal.

Contrastan estos resultados con los obtenidos en 1950, que eran más netos y convincentes, a pesar de que en la actualidad operamos con pepsinas purísimas y geles adsorbentes de irreprochable calidad; siendo de notar que con los resultados de las preparaciones de nuestra observación coinciden en absoluto los que hemos observado empleando preparaciones de laboratorios extranjeros de la máxima solvencia científica.

No está suficientemente claro el mecanismo de la sensibilización en cuanto a las fracciones proteicas del suero. Hay muchos hechos de difícil interpretación por las diferencias obtenidas entre los experimentadores; mas con todo, se deduce que los resultados de las pruebas anafilácticas no permiten actualmente una metodización satisfactoria que sea utilizable en la práctica de los laboratorios de sueroterapia. Es posible que un estudio continuado llegue a poner en nuestras manos un procedimiento útil.

Parece que la suerosensibilización y la globulinosensibilización no son idénticas. Además, en los animales globulinosensibilizados y albúminosensibilizados, la cantidad necesaria para desensibilizar los tejidos sería independiente de la necesaria para provocar el «shock», habiendo sido notado por Winter que la reacción uterina no sirve de guía para deducir la respuesta del animal en general cuando la dosis reactiva se inyecta, puesto que algunos animales pueden responder con «shock», mientras otros, de igual sensibilidad uterina, no reaccionan (1). Siempre habrá fijación, pero «shock» solamente en algunos casos.

Se suponía que los úteros sensibilizados por albúmina y globulina responderían «in vitro» a la globulina y a la albúmina, pero que la sensibilidad de ambas proteínas se descargaría por una de ellas. Y esto es lo que ocurre. Así, si dos porciones de útero sensibilizado para ambas proteínas se disponen en sendos baños y a uno se agrega globulina, después globulina de nuevo, se lava y a continuación se agrega albúmina y al baño que contiene la otra porción se adiciona en primer lugar albúmina, a continuación, otra vez albúmina y, una vez hecho el lavado se agrega globulina, la respuesta al antígeno agregado en último lugar es nula (Winter). Algunas veces, por excepción, los úteros respondieron a la albúmina después de la globulina y a la globulina después de la albú-

(1) Jour. of Phys. 15 octubre 1945. Vol. 104, núm. 2. Cambridge (Proceedings of the Phys. Soc. 1945).

mina (experiencias de Winter); pero, en general, cuando un útero está sensibilizado para ambas proteínas, uno de los antígenos descarga la sensibilización para las dos.

El mecanismo por el cual se liberan las substancias tóxicas por la reacción antígeno-anticuerpo, es aún poco conocido, y, según Schild (1937), la liberación de dichas substancias no se verifica en cantidad suficiente en todos los animales, ni siempre acontece en el mismo tejido.

II

ANTICUERPOS DE LA ENFERMEDAD DEL SUERO

Lo que entendemos por enfermedad del suero habitualmente es el síndrome que surge a los ocho o doce días después de la inyección del suero (urticaria, edemas, artralgias, fiebre, náuseas, vómitos, etc.), o antes, si se trata de reinyectados.

Los anticuerpos invocados se han investigado por numerosos autores por la prueba de Voss, la de Prausnitz-Küstner, la anafilaxia pasiva en el cobayo, la prueba de Ramsdell, las inyecciones intracutáneas, etc. Nuestra hipótesis de que no se produzca la enfermedad del suero (fenómenos séricos secundarios) o se produzca en grado ínfimo, con el empleo terapéutico de las globulinas fermentadas (fermoglobulinas), es la siguiente: Las moléculas de estos productos son más pequeñas y podrían absorberse y eliminarse antes que las moléculas de globulina del suero bruto o las de soluciones de globulinas separadas de éste por precipitación salina, pero sin fermentar. La más pronta eliminación haría más difícil la producción de aglutininas y, por otra parte, al término de cierto número de días quedaría poco antígeno en el organismo tratado para unirse al anticuerpo precipitante, si es que éste se producía. También pensamos que las globulinas fermentadas perdieran parte de la aptitud de originar precipitinas.

Las experiencias de Voss, verificadas por Blittersdorf (1), están en armonía con estas suposiciones. A pacientes inyectados cuatro días antes con suero bruto (cuatro casos) y a pacientes inyectados con suero fer-

(1) Blittersdorf, F. (Zeitschr. ges. innere Med. 3 (7/8 : 213-218, 1948) (Biol. Abst. 24, 1927, 1950).

mentado, les extrajo sangre, administrándola por vía venosa a otros sujetos sensibilizados, produciendo reacción inmediata en el primer caso, y por excepción en el segundo. La prueba de Prausnitz-Küstner le dió reacción inmediata en el lugar dérmico sensibilizado por el suero bruto y a las dieciséis-treinta y una horas, en las zonas previamente inyectadas con suero digerido.

Hemos renunciado a practicar las pruebas de Voss por motivos de índole moral; no nos ha parecido lícito provocar en los humanos un conflicto antígeno-anticuerpo cuyo alcance no podemos prever. Nos hemos limitado a practicar la prueba de Prausnitz-Künstner en los humanos y los ensayos pertinentes en los animales de experimentación.

El papel de las precipitinas en la enfermedad del suero ha sido muy discutido.

Karelitz (Ann. New-York Acad. Sci. 50 (7): 705-717, 1949) Biol. Abst. **25,** 2031, 1951) aduce que parece que no tienen estrecha relación con la enfermedad del suero pasivamente provocada. En 16 sueros probados observó que uno carecía de precipitinas y no producía la E. S., y cinco, que tampoco tenían precipitinas, producían la E. S. Dicho autor no encuentra relación, por otra parte, entre los anticuerpos anafilácticos y los que suscitan la E. S., citando como ejemplo un suero con alto título de precipitinas anticaballo, que era capaz de producir anafilaxia al cobayo, pero no la E. S.

En cuanto a la mayor difusibilidad de las moléculas de las globulinas fermentadas, debemos recordar las observaciones de Hartley (Proc. Roy.Soc. Ser.Biol.Sci. 138 (893). 499-513, 1951) (Biol. Abstr. 13303, 1953), que demuestran que desempeña un papel muy importante la homología y, en cuanto a la especie humana, como receptora, la modificación fermentativa, pero no en el sentido supuesto por nosotros. Hartley ha visto que la globulina digerida inyectada a la mujer en estado avanzado de embarazo no pasa al hijo, y en las cobayas preñadas pasa la antitoxina que conlleve el suero homólogo bruto, pero no la del suero homólogo fermentado. Así, también, el suero bruto equino antidiftérico permite el paso de la antitoxina a la descendencia (experiencias en cobayos) en pequeña proporción y con mayor lentitud que si de la antitoxina es vectora el suero homólogo, e igualmente el paso de la antitoxina de caballo se reduce por la acción proteásica. En cuanto a la eliminación de la antitoxina, los trabajos de Hartley han probado que cuando se inyectan

al cobayo, bajo la piel, cinco a diez unidades de antitoxina diftérica (suero equino), ya sea suero íntegro, fermentado o purificado por simple precipitación sulfática, los animales se hacen Schick-negativos en pocas horas, eliminándose la antitoxina en una semana, a cuyo término se vuelven Schick-positivos. En cambio, la antitoxina homóloga se elimina más despacio que la homóloga fermentada, eliminándose esta última al ritmo que la antitoxina de caballo.

Pruebas de investigación de precipitinas originadas por la inyección de globulinas fermentadas y de suero equino no fermentado.—Los conejos inyectados con dosis periódicas de suero equino puro, cada tercer día, hasta practicar cuatro inyecciones (dos de 0,5 c. c. y dos de 0,3 c. c.) y tres días más con una inyección diaria de 0,3, todas en vena; a los seis días de la última, el ensayo, consistente en superponer a 0,5 c. c. del antisuero, 0,5 c. c. de las diluciones de suero equino, dió reacción evidentemente positiva a la dilución de 1/20.000.

Los conejos inyectados con cantidades de proteína similares en forma de globulina fermentada (preparación C), equivalentes a tres veces más que en la experiencia del suero equino en las cuatro primeras inyecciones y seis veces más en las tres últimas, proporcionaron sueros que sólo daban reacción positiva con diluciones de suero equino al 1/1.000.

Poniendo en contacto, por superposición:

a) 1 c. c. de suero precipitante anticaballo + 1 c. c. de suero equino puro.	Se produce un anillo blanco marcadísimo y mezclando ambos sueros se aprecia un p. p. evidente (+ + + +).
b) 1 c. c. de suero precipitante anticaballo + 1 c. c. de globulina fermentada (preparación H).	Se produce un anillo menos marcado y por agitación un precipitado menos evidente (+ + +).
c) 1 c. c. de suero precipitante antiglobulina digerida + 1 c. c. de suero equino.	Se produce un anillo casi imperceptible, no apreciándose precipitado, objetivamente, por agitación (1).

(1) Recuérdese, sin embargo, que el descubrimiento objetivo de ciertas precipitinas, como las de los alérgicos, por ejemplo, exige recursos especiales.

d) 1 c. c. de suero precipitante antiglobulina digerida + 1 c. c. de globulina digerida (preparación H).	Idem íd. íd.

Con mezclas iguales a las a), b), c) y d) se inyectaron, intracardíacamente, en dosis de un c. c. a tres cobayos nuevos por mezcla. Las de las mezclas a) y b) presentaron: uno, un choque intenso, permaneciendo el cobayo en estado sincopal durante diez minutos, y los demás ligera disnea, rascamiento y alguna ataxia. Los de las mezclas c) y d) presentaron a lo sumo movimientos anormales de masticación (véase el apartado correspondiente a los efectos de las inyecciones intracardíacas de sueros íntegros y digeridos en los cobayos nuevos).

Parece, por tanto, que la acción proteásica, en las condiciones expuestas, hace a las globulinas menos aptas para producir las precipitinas, y también menos aptas para ser precipitadas por el suero específico correspondiente.

Los resultados «in vivo» de la inyección de las mezclas por vía cardíaca en el cobayo no sensibilizado están en armonía con el hecho anterior.

Experiencias con sueros de convalecientes de enfermedad del suero.— Hemos investigado el comportamiento del suero equino antidiftérico y de la fermoglobulina, en cantidades equiproteicas, en combinación con el suero de convalecientes de E. S. (1) respecto del dermis de los humanos no tratados con anterioridad con suero equino, sirviéndonos de la reacción de Prausnitz-Küstner, del mismo modo que hicieron Cooke y Spain.

Obtuvimos sangre de los convalecientes de E. S. entre siete y catorce días después de haber desaparecido las manifestaciones genuinas; es decir, en pleno período de convalecencia de la referida enfermedad, teniendo en cuenta que la experiencia demuestra que el período más apropiado para conseguir la máxima concentración de los anticuerpos es el comprendido entre tres y veintitrés días después de la desaparición de los signos clínicos.

Inyectamos en la cara externa del brazo un décima de suero humano

(1) E. S. = enfermedad del suero.

de convaleciente de E. S. y unos centímetros más abajo, **una décima** del mismo suero a individuos no inyectados con anterioridad con suero equino. A las veinticuatro horas, si en el lugar de las inyecciones no había reacción alguna, y, en caso contrario, a las cuatrenta y ocho o setenta y dos horas, inyectábamos en el lugar de la picadura superior **una décima** de una solución de fermoglobulina que contuviera la misma proporción por 100 de proteína que el suero equino al 1/5 que, en dosis de **una décima,** administramos en el lugar de la inyección inferior. En una zona próxima inyectamos estas mismas dosis de ambas soluciones (pruebas testigos).

Serie primera: Suero de convaleciente de E. S. de catorce días: (0,1 c. c.)
Suero equino: 0,1 c. c. de diluc. 1/5 (= 0,0016).
Fermoglobulina: 0,1 c.c . de la diluc. correspondiente.

Serie segunda: Suero de convaleciente de E. S. de tres días.
El suero equino y la fermoglobulina, como en la serie primera.

En los sujetos de la serie primera (cinco casos), la inyección de suero equino produjo: en cuatro, una zona eritematosa evidente y pruriginosa a partir de las veinticuatro horas, y la inyección de fermoglobulina, sólo un eritema palidísimo en tres casos. En todos surgió un habón, sin halo, fugaz.

En los sujetos de la serie segunda (cuatro casos) la inyección de suero equino produjo: en dos, zona eritematosa evidente y pruriginosa, y la inyección de fermoglobulina produjo en dos un eritema muy pálido, sin prurito.

Experiencias de investigación de precipitinas en el suero de convalecientes de E. S.

Mezcla E.

1 c. c. de suero humano de convaleciente de E. S. a los catorce días de desaparecr ésta, y 1 c. c. de suero equino.
Por superposición: No se aprecia nada sensiblemente.
Por agitación: Opalinidad.
Inyección intracardíaca a los quince minutos de un c. c. de la mezcla.

1 cobayo: + rascamiento.
1 » + ligera disnea.
1 » + rascamiento.

Mezcla F.

1 c. c. de suero humano de convaleciente de E. S. a los tres días de desaparecer ésta, mezclado con 1 c. c. de suero equino.
Por superposición: No se aprecia nada sensiblemente.
Por agitación: Opalinidad.
Inyección intracardíaca a los 15' de 1 c. c. de la mezcla.
1 cobayo: + convulsiones clónicas.
1 cobayo: + convulsiones clónicas.
1 cobayo: + + + atasia. Se echa. Muere + + + +

Mezcla G

1 c. c. de suero humano de convaleciente de E. S. a los catorce días de desaparecer ésta, mezclado con 1 c. c. de fermoglobulina digerida a 39°.
Por superposición: No se aprecia nada sensiblemente.
Por agitación: Opalinidad.
Inyección intracardíaca a los 15' de 1 c. c. de la mezcla.
1 cobayo: + rascamiento.
1 cobayo: + rascamiento.
1 cobayo: + ligeras convulsiones clónicas, sin echarse.

Mezcla H

1 c. c. de suero humano de convaleciente de E. S. al tercer día de desaparecer está mezclado con 1 c. c. de fermoglobulina digerida a 39°.
Por superposición: No se aprecia nada sensiblemente.
Por agitación: Opalinidad.
Inyección intracardíaca a los 15' de 1 c. c. de la mezcla.
1 cobayo: + viva inquietud. Ligeras convulsiones clónicas sin echarse.
1 cobayo: + viva inquietud. Ligeras convulsiones clónicas sin echarse.
1 cobayo: + viva inquietud. Ligeras convulsiones clónicas sin echarse.

En los sueros de convalecientes ensayados, no se observa muy objeti-

vamente la presencia de precipitinas frente al suero equino bruto y a las globulinas digeridas, viéndose solamente una opalinidad en el seno de las mezclas. Estas, inyectadas intracardíacamente al cobayo, producen algunos signos de tipo anafiláctico (en un caso la muerte del animal). Más hay que tener en cuenta que los sueros de convalecientes de E. S. adicionados de mertiolato, y que conservábamos en la refrigeradora durante unos meses, inyectados en dosis homólogas por vía intracardíaca a los cobayos no sensibilizados, producían a los animales estados atáxicos inmediatos, pereciendo algunos. Los que resisten a la inyección se rehacen pronto, quedando inapetentes e indiferentes a las excitaciones mecánicas durante algunas horas.

Experiencias de anafilaxia pasiva.

Suero humano de convaleciente de enfermedad del suero (E. S.).

(Recogido a los catorce días de desaparecer los síntomas).

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de E. S. por vía cardíaca
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) } = +

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de E. S. por vía cardíaca
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) } = O

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de E. S. por vía cardíaca
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) } = O

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de E. S. por vía cardíaca
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) } = O

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de E. S. por vía cardíaca
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) } = O

Suero humano de un paciente tratado con fermoglobulina en dosis profiláctica (S. F.).

(Recogido a los 15 días de la inyección).

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de S. F. por vía cardíaca
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) } = +

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de S. F. por vía cardíaca
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) } = O

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de S. F. por vía cardíaca
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) } = O

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de S. F. por vía cardíaca
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) } = O

Suero de conejo precipitante anticaballo (S. C. P. A.)

(Título = 1 : 20.000)

1 cobayo recibe 1 c. c. de SCPA por vía cardíaca.
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) ... } = + + + + (1)

1 cobayo recibe 1 c. c. de SCPA por vía cardíaca.
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) ... } = + + + + (1)

1 cobayo recibe 1 c. c. de SCPA por vía cardíaca.
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) ... } = + + + + (1)

1 cobayo recibe 1 c. c. de SCPA por vía cardíaca.
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) ... } = + + (2)

Suero de conejo precipitante anticaballo, obtenido por inyección de fermoglobulina (S. C. P. F.)

(Título = 1 : 1.000)

1 cobayo recibe 1 c. c. de S. C. P. F. por vía cardíaca.
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) ... ... } = +

1 cobayo recibe 1 c. c. de S. C. P. F. por vía cardíaca.
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) ... ... } = + +

1 cobayo recibe 1 c. c. de S. C. P. F. por vía cardíaca.
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) .. ... } = + —

1 cobayo recibe 1 c. c. de S. C. P. F. por vía cardíaca.
A las 48 horas 1 c. c. s. equino (vía cardíaca) ... ... } = 0

(1) + + + + = choque mortal.
(2) + + = signos anafilácticos atenuados.

Suero humano de convaleciente E. S.

(Recogido a los tres días de desaparecer los síntomas).

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de E. S. por vía cardíaca... } = 0
A las 48 horas 1 c. c. de s. equino (vía cardíaca) ... . }

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de E. S. por vía cardíaca... } = 0
A las 48 horas 1 c. c. de s. equino (vía cardíaca) ... . }

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de E. S. por vía cardíaca... } = 0
A las 48 horas 1 c. c. de s. equino (vía cardíaca) ... . }

1 cobayo recibe 1 c. c. de suero de E. S. por vía cardíaca... } = 0
A las 48 horas 1 c. c. de s. equino (vía cardíaca) ... . }

Suero de conejo precipitante anticaballo

(Título = 1 : 20.000)

1 cobayo recibe 1 c. c. de este suero por vía cardíaca. } = + +
A las 48 horas 1 c. c. de fermoglobulina lote H ... ... }

1 cobayo recibe 1 c. c. de este suero por vía cardíaca. } = + +
A las 48 horas 1 c. c. de fermoglobulina lote H ... ... }

1 cobayo recibe 1 c. c. de este suero por vía cardíaca. } = +
A las 48 horas 1 c. c. de fermoglobulina lote H ... ... }

1 cobayo recibe 1 c. c. de este suero por vía cardíaca. } = +
A las 48 horas 1 c. c. de fermoglobulina lote H ... ... }

Suero precipitante antifermoglobulina de caballo.

(Título = 1 : 1.000).

1 cobayo recibe 1 c. c. de este suero por vía cardíaca. } = + + + + (1)
A las 48 horas 1 c. c. de fermoglobulina lote H ... ... }

1 cobayo recibe 1 c. c. de este suero por vía cardíaca. } = + + + +
A las 48 horas 1 c. c. de fermoglobulina lote H ... ... }

1 cobayo recibe 1 c. c. de este suero por vía cardíaca. } = + + + +
A las 48 horas 1 c. c. de fermoglobulina lote H ... ... }

1 cobayo recibe 1 c. c. de este suero (vía cardíaca) (2) } = + +
A las 48 horas 1 c. c. de fermoglobulina lote H ... ... }

(1) + + + + = choque mortal.
(2) Este animal recibió solamente parte de la inyección.

Experiencias de anafilaxia inversa.

Inyección de 1 c. c. de fermoglobulina digerida a 39° (Lote H).

1 cobayo recibe 1 c. c. de esta ferm. por vía cardíaca ...
A las 48 horas 1 c. c. suero de conejo (1) (vía cardíaca) } = O

1 cobayo recibe 1 c. c. de esta ferm. por vía cardíaca ...
A las 48 horas 1 c. c. suero de conejo (1) (vía cardíaca) } = O

1 cobayo recibe 1 c. c. de esta ferm. por vía cardíaca ...
A las 48 horas 1 c. c. suero de conejo (1) (vía cardíaca) } = O

Inyección de 1 c. c. de suero equino.

1 cobayo recibe 1 c. c. de s. equino (vía cardíaca) ...
A las 48 horas 1 c. c. suero conejo p. p. anticaballo } = O

1 cobayo recibe 1 c. c. de s. equino (vía cardíaca) ...
A las 48 horas 1 c. c. suero conejo p. p. anticaballo } = O

1 cobayo recibe 1 c. c. de s. equino (vía cardíaca) ...
A las 48 horas 1 c. c. suero conejo p. p. anticaballo } = O

Estas experiencias, consistentes en administrar primero globulina digerida o suero equino, y en segunda inyección suero antiglobulina y suero anticaballo, respectivamente, dan resultados completamente negativos.

Vemos, pues, que la anafilaxia pasiva no se produce prácticamente sensibilizando con suero de E. S. ni con suero de pacientes inyectados con globulina digerida, cuando se trata de desencadenar el cuadro con suero equino. Pero si se inyecta primero un suero precipitante experimental, la crisis surge con toda nitidez cuando dicho suero es anti-caballo (suero bruto). Por otra parte, si se inyecta primero suero precipitante antiglobulina digerida, los signos anafilácticos son muy leves, cuando la inyección segunda es de suero equino, pero si se trata, en dicha segunda inyección, de globulina digerida, la crisis es típica.

(1) Suero precipitante antifermoglobulina.

III

COMPROBACIONES CLINICAS

Vamos a referirnos, exclusivamente, a las preparaciones procedentes de digestión proteásica, que han sido objeto de una experiencia mucho más amplia.

Van tratados, con las Fermoglobulinas, muchos centenares de pacientes sin que se hayan observado casos de enfermedad del suero en su forma genuina, o sea lo que se entiende por fenómenos séricos secundarios. Por tanto, nuestras afirmaciones del año 1947 (1) podemos mantenerlas. Entonces decíamos que no habíamos observado un solo caso de síndrome típico y que solamente se habían producido manifestaciones monosintomáticas fugaces, en reinyectados, en el 11,26 por 100. Hoy día, a pesar de haberse multiplicado las aplicaciones de Fermoglobulinas, especialmente en los sujetos inyectados anteriormente con suero equino o sueros purificados por las precipitaciones salinas, sin desnaturalización propiamente dicha, podemos asegurar que esta clase de preparaciones debe sustituir en todos los casos a los sueros brutos y a las preparaciones usuales constituídas por seudoglobulinas sin desnaturalización fermentiva y adsorción ulterior de la proteína inespecífica.

Se sabe por los clínicos que la enfermedad del suero en los reinyectados, especialmente cuando se trata del suero antitetánico, es verdaderamente temible. De esto tienen gran experiencia los cirujanos especializados en las heridas producidas por asta de toro, siendo altamente interesante, a este respecto, la aportación del Dr. Jiménez Guinea (2). A este ilustre cirujano le preocupaba hondamente la suerte de sus operados que, teniendo que ser sistemáticamente sometidos a la sueroterapia pasiva antes de las intervenciones de rigor, volvían a caer heridos y a tener que ser sometidos de nuevo a la sueroterapia profiláctica antitetánica, produciéndose cuadros verdaderamente aparatosos, muchas veces dentro de las primeras veinticuatro horas después de la inyección, con fiebre alta, vómitos, estado hipotensivo y manifestaciones cutáneas de fuerte

(1) *Rev. Clin. Esp.*, 27, 432-436. 1947.

(2) L. Jiménez Guinea. *Boletín del Consejo Gral. de Colegios Médicos.*, 4, número 19, p. 13. abril 1948.

urticaria. Eran, también, frecuentísimas las formas secundarias tardías, presentándose urticaria, grandes edemas de párpados y escroto, artralgias molestísimas e incluso edema de la glotis. En otras ocasiones se presentaba sólo la urticaria y en determinados pacientes preponderaba el cuadro cardiovascular en forma de crisis hipotensivas con carácter de verdaderas lipotimias de repetición; citando el expresado autor el caso de un lidiador que por la repetición de los accidentes traumáticos y por el estado de gravedad con que se presentaban en él las manifestaciones séricas, constituía un motivo de honda preocupación, ya que siempre que caía herido se planteaba el mismo problema y cada vez en forma más alarmante, a pesar de poner en juego los recursos clásicos.

La experiencia clínica del Dr. Jiménez Guinea es dilatada y de extraordinario interés para la terapia por las globulinas antitetánicas proteásicamente desnaturalizadas, ya que no ha vuelto a observar, a partir de su empleo, ninguna manifestación de enfermedad del suero, ni aun en el caso del lidiador citado cuyas manifestaciones séricas eran tan alarmantes, a pesar de haber inyectado a numerosísimos heridos que habían sido sometidos con anterioridad a la acción del suero antitetánico bruto, figurando también casos de inyección anterior de suero proteásicamente desnaturalizado.

Pues bien, con las más excelentes preparaciones globulínicas del tipo de las que venimos ocupándonos se pueden observar comportamientos que coinciden con lo expuesto en cuanto a anafilaxia «in vivo» y anafilaxia «in vitro». No hay una relación directa, estrecha y evidente, entre la clínica y el laboratorio a este respecto.

En todos los casos las globulinas proteásicamente modificadas obran por vía subcutánea o muscular, sin producir los fenómenos séricos secundarios típicos ni aun en los inyectados anteriormente con suero equino; pero en todos los casos dichas globulinas producen, a veces, choques anafilácticos en los cobayos sensibilizados y, por otra parte, no en todos los casos se ve seguida de respuesta negativa la acción de aquéllas sobre el intestino aislado de animales sensibilizados para el suero equino o para las mismas globulinas desnaturalizadas.

El hecho de producirse substancias inespecíficas en el seno de tales productos, a causa del proceso de su elaboración, y que se traducen, a veces, por respuestas anormales «in vivo» e «in vitro» por parte de los animales nuevos (no sensibilizados) y, a veces, muy levemente, ésta es

la verdad, por la acción del suero equino «in vivo» en cobayos sin sensibilizar (véase anteriormente), nos podría llevar, con un criterio simplista, a admitir en todos los casos una inespecificidad absoluta en cuanto a los factores desencadenantes inherentes a las globulinas fermentadas. Mas como no es posible, actualmente, eliminar o neutralizar las substancias inespecíficas que obran en el terreno experimental, no estamos autorizados a establecer que, puesto que la clínica evidencia la desnaturalización, lo que en el laboratorio ocurra en contra de esto, sea debido a inespecificidad; y esto por dos motivos: porque las globulinas no pierden su condición por el hecho de tratarlas fermentativamente en los límites que permite la terapéutica y porque toda la experiencia clínica a que nos referimos afecta a la vía subcutánea o intramuscular; siendo nuestro criterio que no se practique jamás una inyección endovenosa de globulina fermentada a un sujeto inyectado anteriormente con suero equino sin rodearse de todas las precauciones que se observarían empleando los sueros brutos; y aun en los primoinyectados, nuestro consejo es que se inquieran los antecedentes alérgicos del paciente y sus allegados antes de proceder a la inyección intravenosa y, en todo caso, observando determinadas precauciones, ya que con este modo de administración que obra tan expeditivamente, toda cautela es poca.

RESUMEN

Las soluciones de globulina equina proteásicamente modificada, inyectadas, en determinadas proporciones e intracardíacamente, a los cobayos sensibilizados por el suero equino bruto, desencadenan el «shock» mortal con menor frecuencia, en general, que el suero equino sin modificar; e inyectadas a los animales sensibilizados por las mismas globulinas modificadas, acusan un elevado poder desencadenante.

Ensayados «in vitro» (prueba de Schultz-Dale), la cuantía de las respuestas acusa, en general, diferencia entre la acción de las globulinas fermentadas y del suero equino bruto sobre el intestino de los cobayos sensibilizados con este producto, pero sin regularidad ni constancia; observándose en el intestino de los animales sensibilizados con las globulinas modificadas que el suero equino origina, a veces, respuestas superiores a las de la histamina ($1 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-8}$).

La prueba de Prausnitz-Küstner se muestra a favor de que la modificación encimática de las globulinas sea un hecho positivo.

El resultado de la investigación de precipitinas en las mezclas de sueros de convalecientes de enfermedad del suero y de suero equino; y de suero de convalecientes y globulinas modificadas, no es convincente.

Parece ser que las globulinas fermentadas tienen menor aptitud para formar precipitinas y menor susceptibilidad de ser precipitadas.

Han sido negativas las pruebas de anafilaxia pasiva con mezclas de suero equino y suero de convalecientes de fenómenos séricos y con mezclas de suero equino y suero de enfermos inyectados con globulinas fermentadas; siendo positivas las de anafilaxia pasiva practicadas con mezclas de suero antifermoglobulínico de conejo y fermoglobulina, a pesar de que en este último caso no sea evidente la producción de precipitinas en la mezcla.

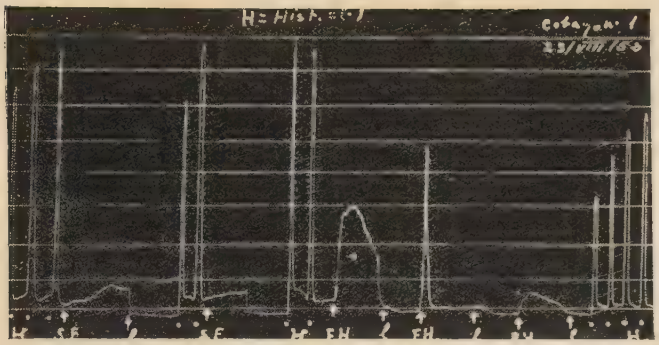
También han sido negativas las pruebas de anafilaxia inversa en el cobayo, bien administrando primeramente globulina fermentada y en la segunda inyección suero experimental (de conejo), antiglobulina fermentada o bien se inyecte primeramente suero equino, y en la segunda inyección, suero anticaballo.

Las globulinas fermentadas, a pesar de no estar totalmente desnaturalizadas, según se deduce de las puebas experimentales, no producen, prácticamente, los fenómenos séricos secundarios.

BIBLIOGRAFIA

BLITTERSDORF, F.—1948. Zeitschr. ges. innere Med. 3 (7/8): 213-218.
COGHILL, FELL, CREIGHTON y BROWM.—1940. J. Imm. 39; 207.
GIMENEZ GUINEA, L.—1948. Bol. C. G. Colg. Méd. Esp. 4, 13.
HANSEN, A.—1938. Bioch. Zeitschr., 299; 563.
——— 1938. C. R. S. B., 129;213.
——— 1948. Act. Path., 25; 460.
HARTLEY, P.—1951. Proc. Roy. Soc. Ser Biol. Sci., 138 (893): 499-513.
HEWITT, L. F.—1936. Biochem. Jour., 30; 2.229.
KARELITZ, S.—1949. Ann. New-York Acad. Sci., 50 (7): 705-717.
MAC MEEKIN, T. L.—1940. Jour. of Amer. Chem. Soc., 62; 3.393.

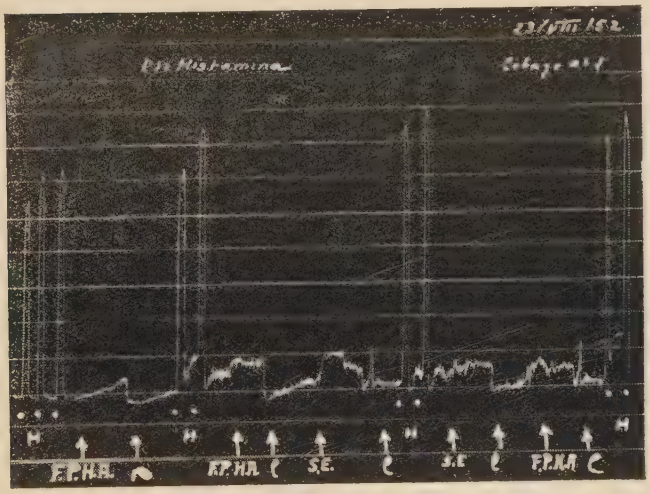
MODERN Y RUFF.—1938. C. R. S. B., 129; 851.
MORENO DE VEGA, F.—1945. Rev. Clín. Esp., 19; 96-107.
——— 1946. Rev. Clín. Esp., 22; 114-119.
——— 1947. Rev. Clín. Esp., 37; 432-436.
——— 1950. Microb. Esp., 3; 43-56.
POPE.—1939. Brit. J. Exp. Path., 20; 201, 213.
ROCHE, DERRIEN Y MANDEL.—1944. C. R. S. B., 138; 515-600-634-651-665-676 y 743.
SANDOR.—1939. C. R. S. B., 130; 840 y 1.187.
SANDOR Y RICHOU.—1939. C. R. S. B., 131; 461.
TAYEAUX Y MARTIN.—1944. C. R. S. B., 138; 923.



Gráfica núm. 1.

Cobayo sensibilizado con suero equino (S.E.) 46 días antes.
Conc. H = 2×10^{-5}.
Tiempo de concentración: 30".
Intervalo entre cada dosis: 2'.
1 = lavado.
H = Histamina.
F.H. = Preparación H (7,8 % Prot.)

(G.ª de Jalón.)

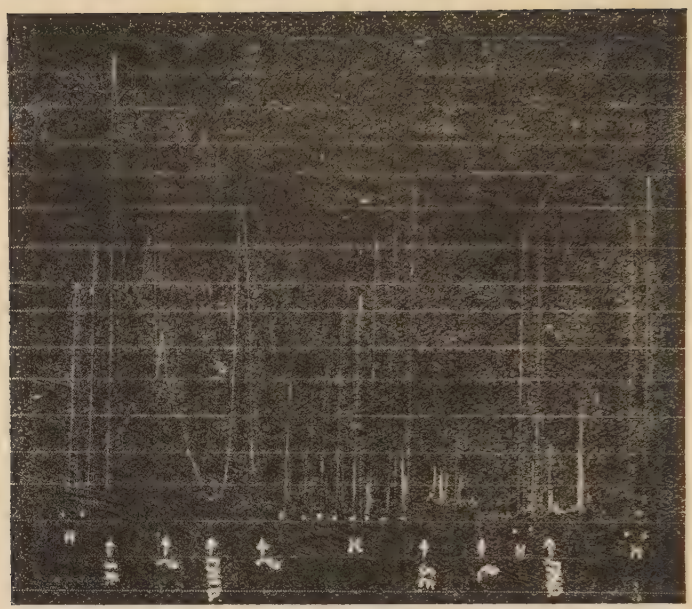


Gráfica núm. 2.

Segmento de intestino perteneciente al mismo cobayo de la gráfica 1.

1 = lavado.
H = histamina; conc. copa = $2 \times 10^{-}$.
S.E. = Suero equino.
F.P.H A. = Preparación A.

(G.ª de Jalón.)



Gráfica núm. 3.

Segmento intestinal de cobayo sensibilizado con suero equino

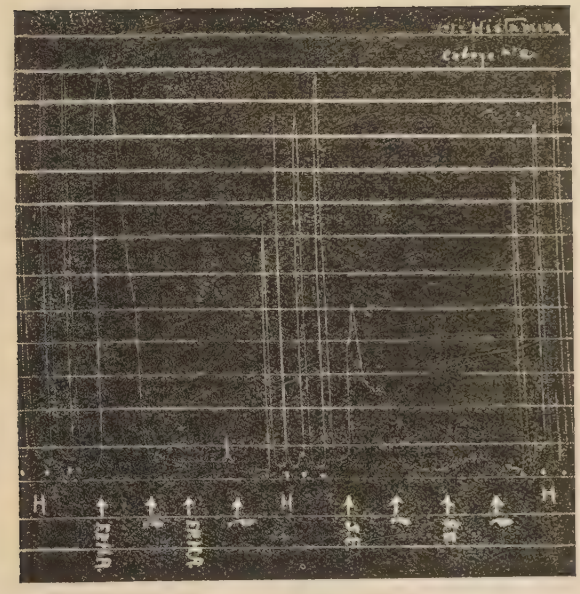
1 = lavado.

H = Histamina; conc. en copa = 2×10^{-5}.

S.E. = Suero equino.

F.P.H.D. = Preparación D.

(*G.ª de Jalón.*)

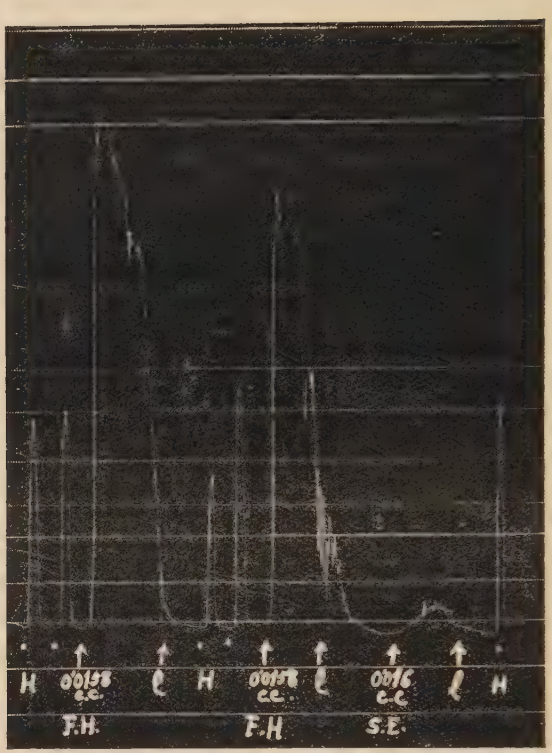


Gráfica núm. 4.

Segmento intestinal de cobayo sensibilizado con suero equino.

H = histamina; conc. en copa = 2×10^{-n}
1 = lavado.
F.P.H A. = Preparación A.
S.E. = Suero equino.

(*G.ª de Jalón.*)



Gráfica núm. 5.

Cobayo normal sin sensibilizar.

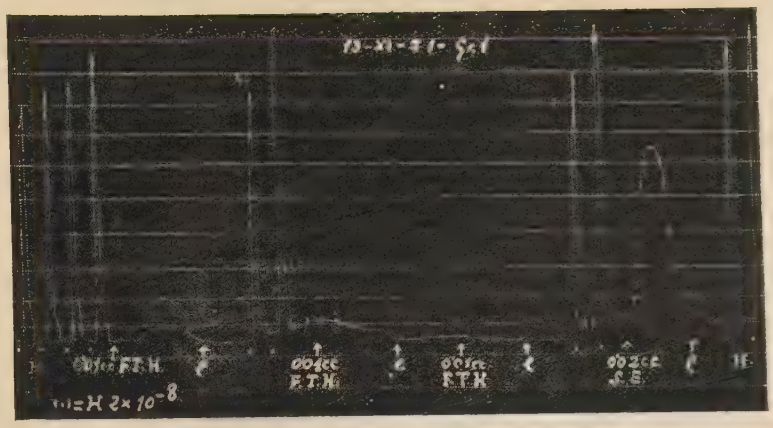
1 = lavado.

H = Histamina; conc en copa = 1×10^{-8}.

F.H. = Preparación H (Prot. 7,81 %).

S.E. = Suero equino (Prot. 7,7 %).

(*G.ª de Jalón.*)



Gráfica núm. 6.

Intestino aislado (íleon distal) de cobayo sensibilizado con la preparación F. dan. (F.T.H.).

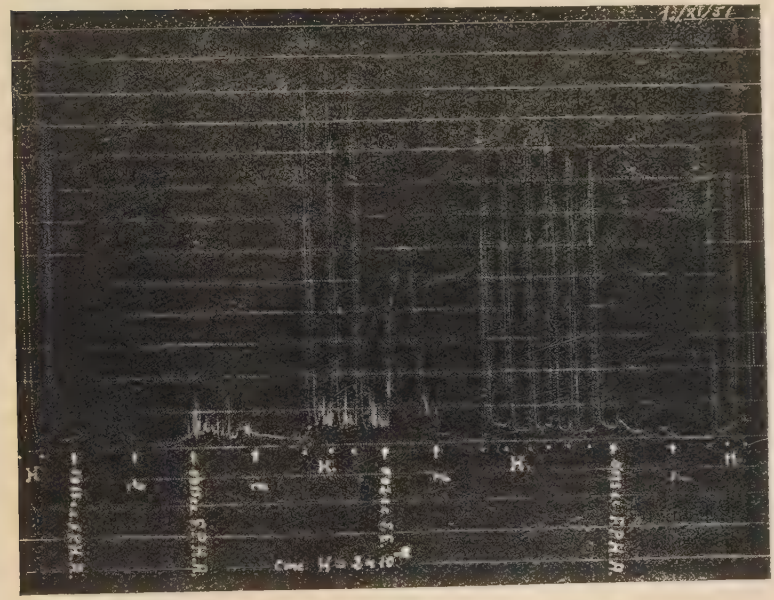
1 = lavado.

H = histamina; conc. H. en copa = 2×10^{-8}

F.T.H. = Preparación F. dan.

S.E. = Suero equino.

(G.ª de Jalón.)



Gráfica núm. 7.

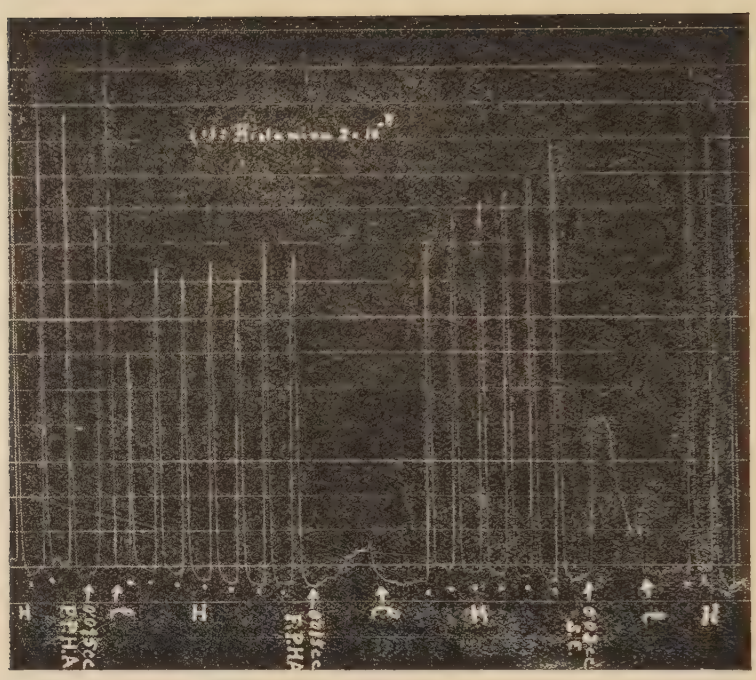
Cobayo sensibilizado con la preparación A. (F.P.H A.).

H = Histamina; conc. en copa = 2×10^{-8}.

S.E. = Suero equino normal.

1 = lavado.

(G.ª de Jalón.)



Gráfica núm. 8.

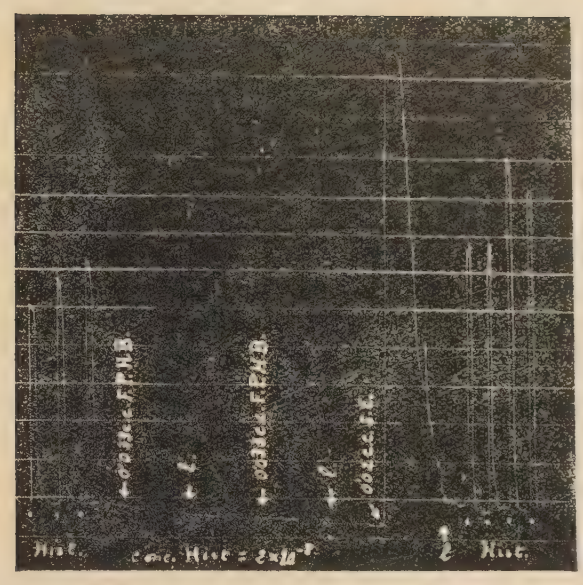
Cobayo sensibilizado con la preparación A. (F.P.H.A.).
Intestino aislado (íleon distal).

l = lavado.

H = Histamina; conc. en copa = 2×10^{-8}.

S.E. = Suero equino.

(*G.ª de Jalón.*)

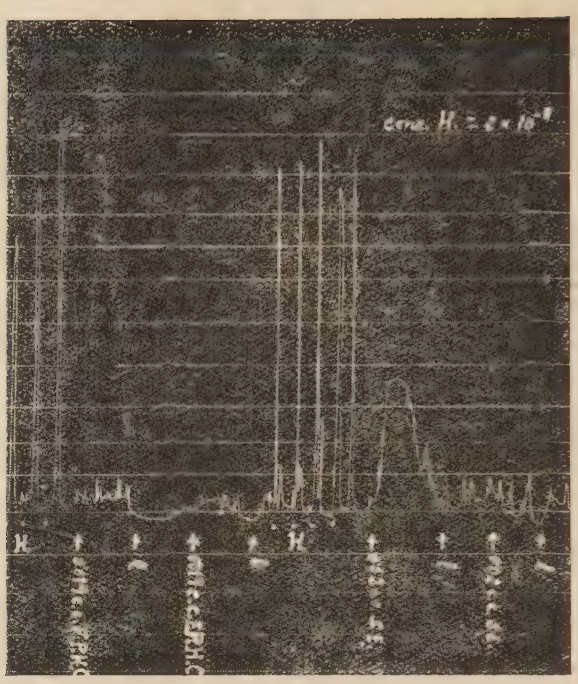


Gráfica núm. 9.

Cobayo sensibilizado con la preparación B. (F.P.H.B.).

Intestino aislado (íleon distal).
Hist. = histamina; conc. = 2×10^{-8}.
1 = lavado.
S.E. = Suero equino.

(G.ª de Jalón.)

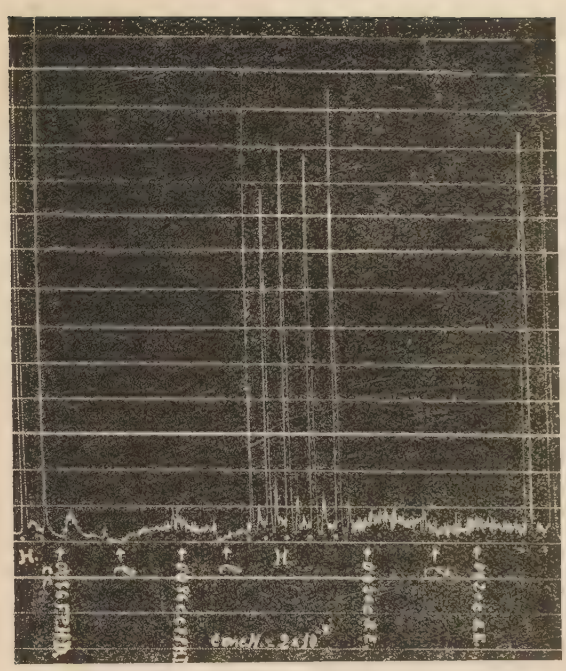


Gráfica núm. 10.

Cobayo sensibilizado con la preparación C. (F.P.H.C.).

1 = lavado.
H = histamina; conc. en copa = 2×10^{-5}.
S.E. = Suero equino.

(*G.ª de Jalón.*)

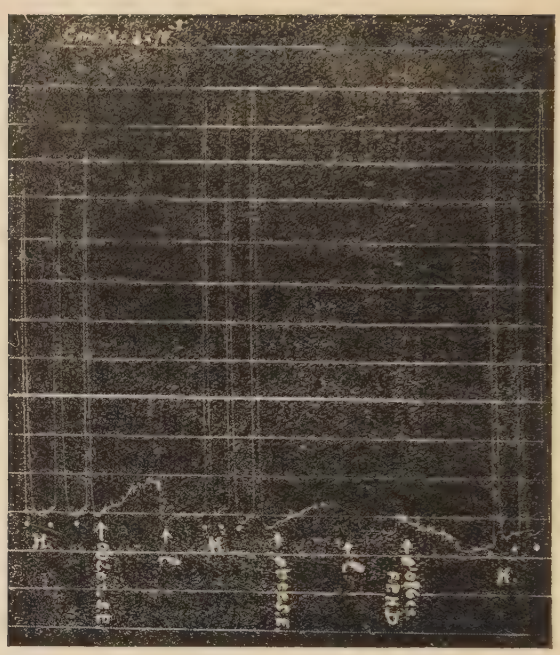


Gráfica núm. 11.

Cobayo sensibilizado con la preparación D. (F.P H.D.).

H = histamina; conc. en copa = 2×10^{-5}.
1 = lavado.
S.E. = Suero equino.

(*G.ª de Jalón.*)



Gráfica núm. 12.

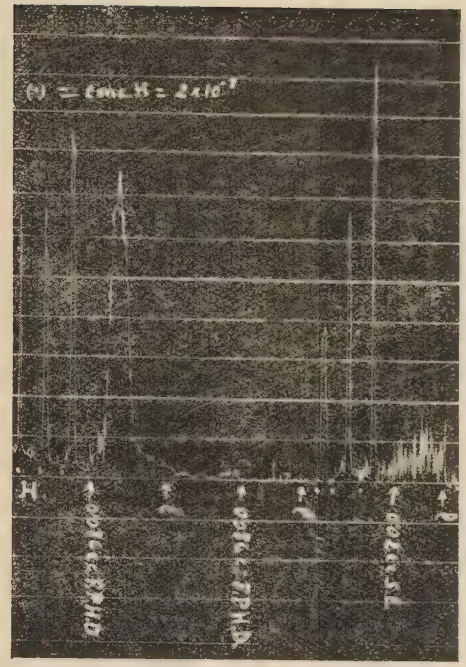
Segmento intestinal perteneciente al mismo cobayo que el de la gráfica anterior, sensibilizado con la preparación D.

H = histamina; conc. en copa = 2×10^{-5}.

1 = lavado.

S.E. = Suero equino.

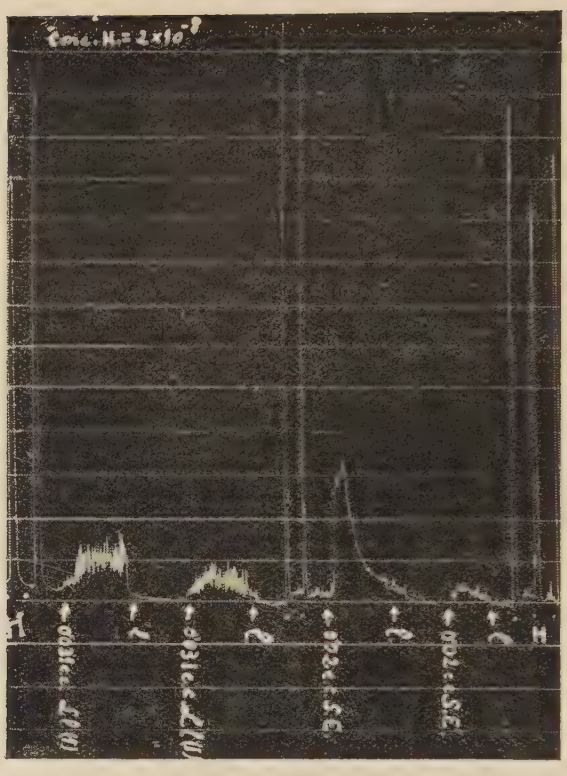
(*G.ª de Jalón.*)



Gráfica núm. 13.

Cobayo sensibilizado con la preparación D (F.P H.D.).
1 = lavado.
H = Hist.; conc. en copa = 2×110^{-5}.
S.E. = Suero equino.

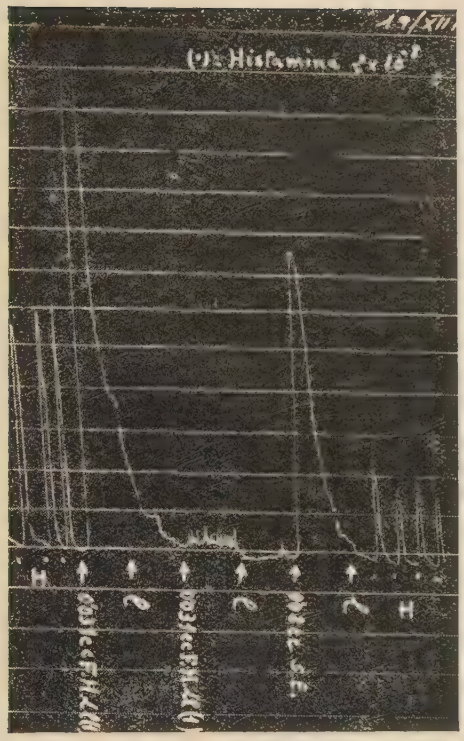
(*G.ª de Jalón.*)



Gráfica núm. 14.

Cobayo sensibilizado con suero equino (S. E.).
H = histamina; conc. en copa = 2×10^{-8}
I = lavado.
LI = Preparación H LI. (1).

(*G.ª de Jalón.*)



Gráfica núm. 15.

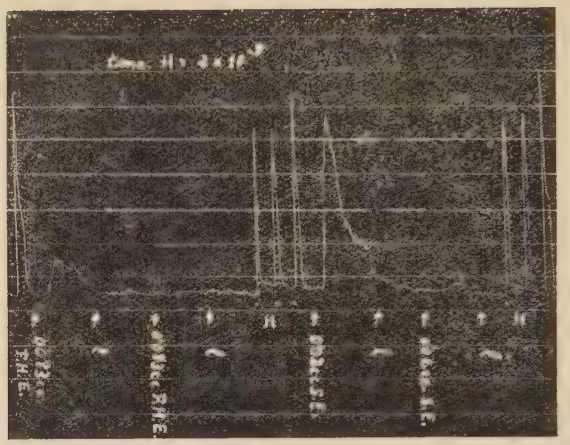
Cobayo sensibilizado con suero equino (S.E.).

I = lavado.

H = Hist.; conc. en copa = 2×10^{-8}.

Ll(I) = Preparación H.Ll. I.

(*G.ª de Jalón.*)



Gráfica núm. 16.

Cobayo sensibilizado con suero equino (S.E.).
H = histamina; conc. H. en copa = 2×10^{-5}
1 = lavado.
F.H.E. = Preparación D.

(*G.ª de Jalón.*)

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA AGRARIA DE LA UNIVERSIDAD DE PISA

PRESENCIA DE ESPECIES DE «TRICHOSPORON» EN ORUJOS DE OLIVA

por

O. Verona.

Los residuos de la expresión de las aceitunas (orujo) vienen siendo utilizados, como es bien sabido, para una ulterior extracción del aceite.

Durante el período de prensado y de conservación, siempre que no se ponga en condiciones especiales de almacenamiento o no sea trabajado inmediatamente, el orujo sufre con el tiempo notables deterioraciones, dando rendimientos en aceite cuantitativamente inferiores, y, por el considerable aumento de la acidez, cualitativamente decadentes.

Las causas que determinan estas pérdidas son evidentes y se atribuyen a la actividad de las lipasas, con referencia a las que normalmente contiene el fruto y a las que producen los microorganismos que se desarrollan en la masa. El desarrollo microbiano en los orujos amasados es grande y debido a la humedad residual, que se acerca aproximadamente a un 20-30 por 100, y al aumento del grado térmico que, entre otros factores, en la masa misma, pueden favorecer el desarrollo de las microformas.

Por lo que se refiere al aspecto microbiano de la cuestión, ya antes de ahora hemos tenido ocasión de hablar de ello (1), poniendo de relieve cómo la «facies» microbiológica de los orujos se ha caracterizado, sobre todo, por la presencia predominante de levaduras. Entre éstas se encuentran la *Rhodotorula mucilaginosa* (Jorg.) Harrison, la *Candida parapsilosis* (Ashf.) Lang. y Tal., *Candida parapsilosis* var. *intermedia* v. Rij. y Ver., *Candida Guilliermondii* (Cast.) Lang. y Guerra y además la *Candida olea* v. Rij. y Ver., considerada hoy idéntica a la *Candida lipolytica* (Harrison) Diddens y Lodder (2, 3).

El pasado año, con ocasión de un viaje a España, tuvimos la oportu-

nidad de tomar en algunos establecimientos en los que se viene trabajando sobre los orujos para la extracción del aceite al sulfuro, algunas muestras de dichos materiales, con el fin de buscar en ellas la eventual presencia de levaduras.

Los cultivos por diseminación sobre placa usando agar-malta dieron resultado positivo y nos llevaron al aislamiento de cinco cepas que fueron designadas por: s1, s2, s3, s4, s5.

El consiguiente estudio sistemático informó que se trataba de especies referibles todas al género Trichosporon y todas, verosímilmente, a una misma especie, no habiendo encontrado entre las varias cepas diferencias ni morfológica, ni fisiológica, ni en los cultivos.

Los caracteres fundamentales pueden resumirse así (4):

—**Desarrollo en infusión de malta.**—Después de tres días a 25° C se desarrollan con bastante rapidez células polimorfas, ovaladas, cilíndricas y alargadas, de dimensiones que varían entre unas 3,4-4 por 4,2-8 μ hasta unas 3,4-5,8 por 18-20 μ e incluso de mayor longitud. Con el tiempo se forman también filamentos micelares.

Al final del primer día se origina en la superficie un anillo en relieve y después una membrana que al principio es fina, pero que después se transforma en espesa y pesada, presentando la superficie rugosa.

—Sobre **agar-malta** se forma una vegetación lisa en sus comienzos, pero que después se hace estructurada, presentando aspecto rugoso típico, cerebroide. Tal aspecto arrugado es aún más evidente sobre agar-alubias.

Morfológicamente se repite el cuadro observado en la infusión de malta: también células de variada forma y tamaño, acompañadas de un discreto desarrollo micelar.

—El **microcultivo sobre porta-objetos** permite observar un buen desarrollo de micelio y formación abundante de blastosporas y de artrosporas. Es difícil establecer la correlación entre la formación de blastosporas y artrosporas, pero parece que las blastosporas prevalecen sobre las artrosporas.

—**Fermentación.**—No existe.

—**Asimilación de azúcares.**—Positiva para la glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa; negativa para la lactosa.

—**Asimilación de nitratos.**—Negativa.

—**Utilización del etanol.**—Desarrollo bueno con formación de sedimento.

La referencia especiológica no es fácil de hacer porque el cuadro presentado en el notable trabajo de Lodder y Kreger-van Rij debe entenderse relativo únicamente a las especies recogidas y conservadas en el C. B. S. de Baarn-Delft.

De todas maneras, los caracteres expresados no consienten el encuadramiento de estas cepas entre las especies descritas por Lodder y Kreger-van Rij, ya que en el grupo de las que no fermentan y no asimilan los nitratos no existen especies que asimilen glucosa, galactosa, sacarosa,

1. Aspecto morfológico de Trichosporon, *cepa s5 en agar-malta; 2. Cepa s3 en infusión de malta; 3. La misma en cultivo sobre porta-objetos.*

maltosa y no lactosa. Ni se puede pensar que se trata del Tr. intestans (pese a algunos puntos de contacto), ya que éste no asimila la sacarosa y asimila la lactosa.

Por el contrario, hemos encontrado que las cepas aisladas en los oru-

jos y que se describen, se parecen notablemente por su caracteres fisiológicos al Trichosporo veronae Fl., descrito por Florenzano, que ha encontrado dicha especie en los mostos de uva en fermentación (5).

Tenía interés el ver si estas cepas presentaban una eventual actividad lipolítica. Seguimos un ensayo cualitativo cultivándolas en agar emulsionado con aceite de oliva neutro y azul-nilo; el resultado fué positivo, singularmente en las experiencias de las cepas s4 y s5.

Para tener una noción más exacta fué seguido después otro método. En matraces Erlenmeyer que contenían un ligero sustrato de agar fueron efectuados cultivos separados de las cinco cepas. Cuando el desarrollo fué tal que interesaba toda la superficie del agar, vertimos en los matraces 50 c. c. de aceite de oliva desacidificado y estéril.

Como control tenemos iguales matraces que contienen agar estéril y aceite. Periódicamente dosificamos después, en fracciones de aceite tomadas asépticamente, la acidez que eventualmente se había formado.

Se encontró:

	Acidez expresada en gr. de ácido oléico por 100 gr. de aceite.			
	inicial	al 10° día	al 20° día	al 30° día
Control estéril	1,210	1,210	1,310	1,319
Cepa s1	»	1,466	2,324	2,786
Cepa s2	»	1,400	1,310	1,560
Cepa s3	»	1,460	2,684	5,132
Cepa s4	»	1,460	4,055	8,940
Cepa s5	»	1,906	4,889	9,530

Los datos confirman que las cepas estudiadas presentan una cierta actividad lipolítica; por otra parte, se encuentran diferencias entre cepa y cepa, demostrando más actividad las cepas s3, s4 y s5.

* * *

En resumen, hemos de expresar que el trabajo verificado enriquece la colección de las especies microbianas presentes en el orujo de aceitunas. Se trata en este caso de levaduras de tipo Trichosporon. Ellas

manifiestan una cierta actividad lipolítica que justifica, junto a la actividad de otras especies y de los enzimas lipolíticos normalmente presentes en el orujo, el aumento de la acidez que se produce al mismo tiempo en la masa misma del orujo de oliva, durante el período de conservación.

BIBLIOGRAFIA

(1) **O. VERONA** y **M. VALLEGGI.**—1949. Il problema della conserzione delle sanse di oliva. **Olearia.**

(2) **N. J. W.** van **RIJ** y **O. VERONA.**—1949. Sopra alcuni lieviti delle olive. **Rend. Acc. Naz. Lincei,** vol. VII.

(3) **J. LODDER** y **N. J. W. Kreger** van **RIJ.**—1952. The Yeasts. Amsterdam.

(4) 1953. Según los métodos descritos por **LODDER** y **KREGER-van RIJ** (l. c.).

(5) **G. FLORENZANO.**—1953. Zimología e Zimotecnia del vino en «Nuevo Trattato di Enologia», de P. G. Garoglio, Florencia.

INFORMACION

RENOVACION DE DIRECTIVA

En la Sesión celebrada por la **Sociedad de Microbiólogos Españoles** el día 26 del pasado mes de abril, se efectuó el escrutinio de los votos recibidos para la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva.

En consecuencia, la Junta ha quedado constituída de la siguiente forma

Presidente:	D. Antonio Ruiz Falcó.
Vicepresidente:	D. Gerardo Clavero del Campo.
Secretario:	D. Lorenzo Vilas López.
Tesorero:	D. Miguel Benlloch Martínez.
Bibliotecario:	D. Ricardo Salaya León.
Vocal:	D. Genaro Alas Cores.
»	D. Gabriel Colomo de la Villa.
»	D. Eduardo Gallardo Martínez.
»	D. José García Bengoa.
»	D. Emilio Luengo Arroyo.
»	D. Juan Manuel Martínez-Arroyo Núñez.
»	D. Florencio Moreno de Vega Soler.
»	D. Arnaldo Socías Amorós.

NUEVO SOCIO DE HONOR

Ha sido designado, últimamente, Socio de Honor de la **Sociedad de Microbiólogos Españoles** el destacado virólogo Dr. Kenneth Manley Smith. Doctor en Ciencias por la Universidad de Manchester y en Filosofía por la

de Cambridge, el científico inglés es, asimismo, «Fellow» de la «Royal Society» y Miembro del «Royal College of Science» y ha sido Profesor de Entomología en la primera de las dos Universidades citadas. Actualmente es Director de la «Plant Virus Research Unit» del «Agricultural Research Council», en Cambridge.

El Dr. Smith ha publicado numerosos trabajos acerca de los virus de las plantas y virus de los insectos (enfermedades poliédricas). Entre sus obras podemos destacar las siguientes:

«Recent Advances in the Study of Plant Viruses», «Plant Viruses», «A Textbook of Plant Virus Diseases», «Virus Diseases of Farm and Garden Crops» y «A Textbook of Agricultural Entomology».

ACTAS DE LA SOCIEDAD

MADRID

Acta de la sesión celebrada el día 21 de diciembre de 1953.

Bajo la presidencia de D. Florencio Moreno de Vega y actuando como Secretario D. Lorenzo Vilas, se abre la sesión a las 20,30 horas en el aula del edificio central del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano, 117.

Se aprueba el acta de la sesión anterior. El Sr. Martínez Piqueras expone su trabajo «Sobre la higienización de la leche». A continuación el Sr. Moreno López presenta otro, en nombre propio y en el del Sr. Ruiz Pasantino, titulado «Informe preliminar sobre un nuevo método de va-

loración microbiológica del factor intrínseco antianémico en unidades antigammas en placas pocillo».

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión a las 21 horas.

Acta de la sesión celebrada el día 8 de febrero de 1954.

Bajo la presidencia de D. Antonio Ruiz Falcó y actuando como Secretario D. Lorenzo Vilas, se abre la sesión a las 20,20 horas en el aula del edificio central del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano, 117.

Se aprueba el acta de la sesión anterior. Es admitido como socio D. Juan Manuel Martínez-Arroyo, Doctor en Medicina, de Madrid, presentado por D. Antonio Ruiz Falcó y D. Alejandro Otegui.

El Sr. Presidente da cuenta de que conforme al Reglamento de la Sociedad procede efectuar elecciones para cubrir los cargos de terosero, bibliotecario y cuatro vocales, efectuándose la votación según está prescrito, mediante papeleta remitida, en sobre cerrado, al Secretario de la Sociedad. El plazo de recepción de votos terminaría el 31 de marzo y el escrutinio se podría efectuar en la primera sesión celebrada por la Sociedad en el mes de abril. Asimismo indica que la Junta Directiva propondrá una candidatura, entendiéndose que los nombres propuestos no tendrán más valor que el de orientar a los socios, ya que éstos pueden designar libremente a quienes deseen. Son aprobadas ambas propuestas.

El Sr. Moreno de Vega da lectura a dos trabajos suyos: «Aportación al sifilodiagnóstico» y «Datos complementarios de estudios anteriores acerca de la desnaturalización proteica». El Sr. Presidente y los Sres Urgoiti y Cordón comentan elogiosamente las dos comunicaciones.

Y no habiendo más asuntos que tratar se levanta la sesión a las 21 horas.

Acta de la sesión celebrada, conjuntamente con los Institutos de Edafología y de Entomología, el día 30 de marzo de 1954.

Bajo la presidencia de don Antonio Ruiz Falcó y actuando como Secretario don Lorenzo Vilas, se abre la sesión a las 19,45 horas en el salón de actos de los Institutos «Alonso Barba» y «Alonso de Santa Cruz», del C. S. I. C., Serrano, 119.

Se aprueba el acta de la sesión anterior. El señor Presidente propone el nombramiento de Socio de Honor a favor del Dr. Kenneth M. Smith, Director de la «Plant Virus Research Unit», del «Molteno Institute», de Cambridge (Inglaterra), quien honra este acto con su presencia. Se aprueba la propuesta por unanimidad.

Son admitidos como socios: Don Julio Rodríguez Villanueva, Licenciado en Farmacia, de Madrid, presentado por don Vicente Martínez Piqueras y don Gregorio Fraile, y don Pascual Azcúnaga González y don Pedro Alonso Carrión, Licenciados en Farmacia, de Madrid, presentados por don Lorenzo Vilas y don Vicente Martínez Piqueras.

El señor Cordón da lectura a su trabajo, en colaboración con el señor Martínez: «Introducción general a nuestro estudio experimental de la purificación y desespeciación por vía enzimática de los sueros antitóxicos», al que el señor Moreno de Vega hace comentarios elogiosos.

El señor Vicente Jordana presenta una comunicación sobre: «Efecto de la germinación en la difusión de las bacterias de la podredumbre y pie negro de la patata».

El señor Smith pronuncia una conferencia acerca de «The polyhedral virus diseases of Lepidopterous larvae and the development of virus in the cell nucleus».

Finalmente el señor Presidente entrega el Diploma de Socio de Honor al Doctor Smith, quien agradece con frases cordiales la distinción recibida.

Y no habiendo más asuntos que tratar se levanta la sesión a las 21,45 horas.

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 30 pesetas. Suscripción, 45 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

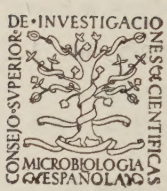
Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.


CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA